Produktion monoklonaler Antikörper gegen experimentelle Gliome durch Fusion von Mausmyelomzellen (X63-Ag8.653) und Maussplenozyten

Christine Süß

1983

Aus dem Institut für Tierpathologie der
Universität München
Vorstand Prof. Dr. E. Dahme
Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. D. Stavrou

Produktion monoklonaler Antikörper gegen experimentelle Gliome durch Fusion von Mausmyelomzellen (X63-Ag8.653) und Maussplenozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Christine Süß
aus Grötzingen

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan

Referent: Prof. Dr. D. Stavrou

Korreferent: Prof. Dr. P.A. Bachmann

Tag der Promotion: 25. Februar 1983

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

MEINEN LIEBEN ELTERN

INHALTSÜBERSICHT

Seite

A. EINLEITUNG 1

B. LITERATURÜBERSICHT 3

I. Antigenität von Hirntumoren 3
II. Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenantigene 6
III. Nachweis tumorassoziierter Antigene mittels monoklonaler Antikörper 14

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN 17

I. Material und Methoden 17
1. Versuchstiere 17
2. Zellmaterial 17
2.1. Zellkulturen 17
2.1.1. Permanente Gliomzellinien 17
2.1.2. Myelomzellinie 18
2.1.3. Hirn- und Nierenzellkulturen 19
2.1.4. Mäuseperitonealzellen 19
3. Konservierung von Zellen und Hybridom-antikörperlösungen 20
4. Immunisierungen 21
5. Zellfusion 21
6. Nachweisverfahren gliombindender Antikörper 26
6.1. Indirekte Immunperoxidasefärbung (IPF) 26
6.2. Indirekte Immunofluoreszenz (IF) 27
6.3. Radioimmunoassay (RIA) 28
6.4. Enzyme-linked-immunosorbent-assay (micro-ELISA) 28
7. Klonierung von Hybridomen 30
8. Intraperitoneale Transplantation von Hybridomen 30
9. Absorptionsversuche 31

Seite

10. Anreicherung von Immunglobulinen durch Ammoniumsulfatpräzipitation 31
11. Agargel-Immundiffusionstest 32
12. Immunelektrophorese 32

II. Ergebnisse 34

1. Fusionsprotokolle 34
2. "Screening"-Ergebnisse während der Klonierung 39
3. Spezielle Untersuchungen 41
3.1. Selektion monoklonaler 79FR-G-41-Antikörper, die normale syngene Rattenzellen nicht erkennen 41
3.2. Kreuzreaktionen selektierter monoklonaler Antikörper mit anderen chemisch induzierten Rattengliomen 49
3.3. Stabilität der Gliomantigene 52
3.4. Bestimmung der Immunglobulinklasse 52
3.4.1. Immunodiffusion 52
3.4.2. Immunelektrophorese 54
3.5. Absorptionsversuche 54
4. Intraperitoneale Transplantation von Hybridomen und Ascitesgewinnung 59

D. DISKUSSION 62

E. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY 69

F. LITERATURVERZEICHNIS 72

A. EINLEITUNG

Der Schwerpunkt heutiger Tumorforschung verlagert sich zunehmend auf die Untersuchung der Tumorzellmembran und ihrer Antigenstrukturen. Diese sind, in Form spezifischer oder tumorassoziierter Antigene, Grundvoraussetzung für eine wirksame Immunabwehr beim potentiellen Tumorträger bzw. für eine mögliche Regression bereits vorhandener Tumoren.

Neurogene Tumoren sind aufgrund der besonderen funktionellen und strukturellen Verhältnisse des Nervensystems (Blut-Hirnschranke, Liquorabfluß etc.) und der möglicherweise dadurch bedingten immunologischen Besonderheiten ein interessanter Sonderfall (Scheinberg et al., 1964). Auch Gliomzellen sollen, so berichten viele Autoren, tumorassoziierte Antigene aufweisen. Man versuchte diese genauer zu identifizieren, indem man die zelluläre und humorale Immunantwort von Gliomträgern oder von solchen Individuen studierte, die mit Gliomzellen immunisiert worden waren.

In vivo gewonnene Gliom-Antiseren stellen ein Gemisch von Antikörpern dar, die in ihrer Spezifität und Affinität sehr unterschiedlich sind. Die Heterogenität der Immunseren ist bedingt durch den komplexen Aufbau der Zellmembranoberfläche und durch die individuelle Reaktionslage der immunisierten Tiere.

Solch polyklonale Immunseren sind schwer zu standardisieren und stehen in jener gegebenen Zusammensetzung nicht in beliebiger Menge zur Verfügung.

Um exakt reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können, erhebt sich die Forderung nach monospezifischen, leicht definierbaren Antikörperpräparationen, die nur ein bestimmtes Antigen bzw. eine bestimmte Antigenkomponente erkennen können. Köhler und Milstein (1975) wiesen den Weg, wie man einzelne, die Information zur Antikörperproduktion tragende Milzzellen, ohne daß sie diese Eigen-

schaft verlieren, durch Fusion mit Myelomzellen permanent züchtbar machen kann. Aus den resultierenden "Hybridzellen" lassen sich Klone züchten, die monoklonale Antikörper in ihr Kulturmedium abgeben. Diese sind, da eine Plasmazelle immer nur Antikörper gegen eine bestimmte Determinante produziert (Burnet, 1959), in ihren chemischen und biologischen Eigenschaften völlig identisch.

Die Möglichkeit, monoklonale Antikörper gewinnen zu können, bedeutet einen wesentlichen Fortschritt in dem Versuch, gliomassoziierte Antigene nachzuweisen. Diese Bemühungen liegen in ihren künftigen diagnostischen und therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten begründet. Sie könnten, enzym- bzw. radionuklidgekoppelt, bei der Erkennung solider Gliome oder metastasierter Tumorzellen dienlich sein. Darüberhinaus könnten sie direkt oder indirekt durch Konjugation mit zytotoxischen Substanzen Gliomzellen im Körper gezielt zerstören, womit die Voraussetzungen für eine erfolgversprechende Immuntherapie geschaffen wären. Von Bedeutung dürfte auch die Koppelung von Interferon an monoklonale Antikörper sein, die zu einer erheblichen Stimulation der nicht spezifischen Körperabwehr führt.

B. LITERATURÜBERSICHT

I. Antigenität von Hirntumoren

Seitdem in den fünfziger Jahren die Theorie der immunologischen "surveillance" eingeführt wurde, weisen zahlreiche Untersuchungen darauf hin, daß spontane Hirntumoren Reaktionen des Immunsystems auslösen können (Trouillas, 1971; Coakham, 1974; Wahlström et al., 1974; Kornblith et al., 1974; Sheikh et al., 1977; Woosley et al., 1977; Wikstrand, 1977; de Tribolet et al., 1980). Chemisch induzierte Hirntumoren verhalten sich gleichsinnig (Lim et al., 1972; Tho et al., 1974; Cornain et al., 1975; Stavrou, 1976; Rainbird et al., 1977; Stavrou et al., 1977; 1978a; Cravioto, 1978; Spence et al., 1979; Stavrou et al., 1980).

Die Beobachtung, daß T-Lymphozyten gehäuft in perivaskulären Infiltraten und einzeln zwischen den Gliomtumorzellen vorkommen (Stavrou et al., 1977), weist auf die Bedeutung der zellvermittelten Immunantwort im Gliomgeschehen hin. Moranz et al. (1979) fanden, daß die Zahl der Makrophagen in malignen Gliomen signifikant erhöht ist. Die lymphozytenvermittelte Zytotoxizität wurde in vitro mit Hilfe des "colony inhibition"-Testes und des Mikrozytotoxizitäts-Testes eingehender untersucht (Kumar et al., 1973; Wahlström et al., 1973; Woosley et al., 1977; Hirt et al., 1976; Bilzer et al., 1981).

Um gliomassoziierte Antigene nachzuweisen, haben zahlreiche Autoren die humorale Immunantwort auf spontane und chemisch induzierte Gliomzellen untersucht (Kornblith et al., 1974; Stavrou et al., 1978; Pfreundschuh et al., 1981).

So immunisierte z.B. Coakham (1974) Kaninchen mit menschlichen Astrocytomzellen und absorbierte das Serum mit

verschiedenen Geweben einschließlich normalem adulten Hirn, fetaler Niere, Leber, Schilddrüse, fetalem Herz und Gehirn verschiedener Entwicklungsstufen und zahlreichen Tumorzelllinien, die nicht von Geweben neuroektodermalen Ursprungs stammen. Trotz dieser umfangreichen Absorptionsverfahren blieb die komplementabhängige Zytotoxizität des Antiserums für die Astrocytomzellen erhalten. Dagegen waren mehrere Astrocytomlinien in der Lage, die Antikörper zu absorbieren, die für die Zytotoxizität des Serums gegen die zur Immunisierung verwendeten Astrocytomlinie verantwortlich waren. Wikstrand et al. (1979) und Schnegg et al. (1981) versuchten durch ähnliche Absorptionsmethoden die Antigenstrukturen der Tumorzelle genauer zu charakterisieren. Sie unterschieden dabei (a) Antigene, die allen Zellen neuroektodermalen Ursprungs eigen sind, (b) Antigene, die in malignen Gliomen, adultem und fetalem Hirn vorkommen und (c) Antigene, die nur malignen Gliomen eigen sind. Fields et al. (1975) erzielten vergleichbare Ergebnisse an nitrosoharnstoff-induzierten Tumoren des Nervensystems. Solche Befunde sind weitere Hinweise für das mögliche Vorkommen tumorassoziierter Antigene, die an der Zellmembran lokalisiert sind.
Kreuzreagierende Antigene, wie sie bei Hirntumoren des Menschen gefunden wurden (Coakham, 1974; Kornblith et al., 1974; Wahlström et al., 1974; Wikstrand et al., 1977; Pfreundschuh et al., 1978; Coakham et al., 1980), sollen nach Herberman (1977) an chemisch induzierten Tumoren selten vorkommen, konnten jedoch u.a. von Steele et al. (1974) und Hellström et al. (1978) beschrieben werden.

Neurogene Tumoren lösen im autologen und syngenen System nur eine schwache Immunantwort aus. Rainbird et al. (1977) fanden unter sechs äthylnitrosoharnstoff-induzierten Schwannomen nur einen Tumor mit guten immunogenen Eigenschaften. Ähnliches zeigten Cornain et al. (1975); Stavrou

et al. (1978a) und Spence et al. (1979).
Daher versuchte man, zunächst mit unterschiedlichem Erfolg, die Antigenität von Tumorzellen in Immunisierungsversuchen durch den Zusatz von Adjuvantien zu beeinflussen. Von Erfolgen, d.h. Verlängerung der Überlebenszeit, Rückgang der Tumorhäufigkeit, Erhöhung der Resistenz, berichteten Baldwin et al. (1973), Weiss et al. (1961), Sjögren et al. (1969). Hingegen führten die diesbezüglichen Experimente bei anderen Autoren zu negativen Resultaten bzw. sogar zu einer Beschleunigung des Tumorwachstums (Albright et al., 1975; Medina et al., 1973; Spence et al., 1979).
Auch der Versuch, die Zellmembran durch Vibrio-cholerae-neuraminidase zu verändern oder durch Lektine (Concanavalin A) die Antigenität zu steigern, führte zu kontroversen Ergebnissen (Lindeman et al., 1967; Sanford, 1967; Ray et al., 1975; Hauschka et al., 1971; Prim et al., 1978; Shoham et al., 1970; Simmons et al., 1975; Elling et al., 1980).
Chemisch, insbesondere mit Nitrophenylreagenzien modifizierte Zellen, ließen eine beträchtliche Steigerung ihrer antigenen Eigenschaften in vivo (Shearer, 1974) und in vitro (Galili et al., 1967) erkennen, wobei es zu keinen nitrophenylspezifischen Reaktionen kam (Köhler et al., 1976). Stavrou et al. (1980) modifizierten Rattengliomzellen mit verschiedenen Chemikalien und immunisierten mit ihnen syngene Tiere. Den deutlichsten Anstieg zytotoxischer Serumantikörper erzielten sie mit Hilfe Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) behandelten Zellen. Auch Zänker et al. (1981) fanden unter Verwendung gleichartig präparierten Antigens eine zweifach höhere zytotoxische humorale Immunantwort.
Mit TNBS-modifizierten Zellen immunisierte Ratten waren in der Lage, syngene Gliomtransplantate abzustoßen (Stavrou et al., 1981).

Um Hinweise zu erhalten, ob es sich bei den untersuchten Tumorlinien tatsächlich um Gliaabkömmlinge handelt, wird ihre Eigenschaft ausgenutzt, in vivo und in vitro neuroektodermspezifische Proteine, wie S-100 ("soluble in 100% $(NH_4)_2SO_4$") und GFAP ("glial fibrillary acid protein") zu synthetisieren. Diese können mit der indirekten Immunofluoreszenzmethode nachgewiesen werden (Stavrou et al., 1971; Wechsler et al., 1973).

II. Produktion monoklonaler Antikörper

Die Erkenntnis, daß einige Myelomformen Antikörper produzieren und die von ihnen gebildeten Paraproteine monoklonale Antikörper darstellen, machte die Myelomproteine zum Modell für das Studium der genetischen Steuerung der Immunglobulinsynthese und -struktur. Trotz umfangreicher Bemühungen ist es nicht gelungen, Antigene zu finden, die mit diesen Myelomantikörpern spezifische Bindungen eingehen (Cohn, 1967; Secher, 1980). Parallel zu den Myelomen des Menschen stehen auch solche von Mäusen (Horibata et al., 1970; Potter, 1972) und von Ratten (Galfré et al., 1979) zur Verfügung. Sowohl normale als auch entartete Immunzellen besitzen für die in vitro-Forschung wichtige Vor- und Nachteile. Myelomzellen sind weder in vivo noch in vitro sensibel gegenüber einem antigenen Reiz. Sie lassen sich jedoch im Gegensatz zu Milzzellen permanent als Zellkultur züchten. Milzzellen kann man dagegen durch Stimulation mit einem bestimmten Antigen veranlassen, den passenden Antikörper zu produzieren (Lefkovits, 1972). In der Tat konnte man durch die Kultivierung kleiner Milzfragmente, monoklonale Antikörper gewinnen (Klinman, 1976; Singh et al., 1979).

Mit der Einführung der Hybridomtechnologie konnten Köhler und Milstein (1975) durch die Verschmelzung einer sensibilisierten Milz- und einer Myelomzelle eine Hybridzelle schaffen, die die Eigenschaften beider Eltern behält. Damit begann eine neue Epoche in der immunologischen Forschung.

Köhler et al. (1978) führen folgende Faktoren auf, die die Fusionierbarkeit von Zellen beeinflussen:

1. Unter Verwendung von Milzzellen hyperimmunisierter Tiere ist die Fusionsrate wesentlich höher als nach der Wahrscheinlichkeitsrechnung zu erwarten wäre. Man schloß, daß in diesem Fall die Zellfusion ein nicht zufälliges Ereignis sein müsse und aktivierte B-Zellen die bevorzugten Fusionspartner darstellen. Daher ist die beste Zeit für eine Fusion 3 bis 4 Tage nach der letzten Boosterung (Oi et al., 1978) und nicht am Tage des höchsten Antikörpertiters.
2. Die Fusionspartner sollen onto- und phylogenetisch möglichst nahe verwandt sein. Wenn dies nicht zutrifft, lassen sich die Zellen zu einen nur sehr schwer, wenn überhaupt, verschmelzen und zum anderen verlieren sie ihre spezielle Funktion durch Verlust von Chromosomen während der ersten Passagen nach der Fusion (Köhler et al., 1976; Hengartner et al., 1978; Köhler, 1980; Galfré et al., 1980).

Die derzeit gebräuchlichen Fusionspartner auf dem Gebiet der Tumorforschung stellen Milzzellen und Myelomzellen von Balb/c Mäusen dar. Mit Vorzug werden "non-producer"-Myelomlinienvarianten verwendet, die entweder keine Ketten sezernieren (NSI/1Ag4-I, Köhler et al., 1976) oder solche, die nicht mehr synthetisieren (X63-Ag8.653, Kearney et al., 1979; Sp2/OAg14, Shulman, 1978). Auf diese Weise erhielt man Hybridzellen, die nur Antikörper der zuvor spezifisch stimulierten Milzzellen produzieren und

keine gemischten Immunglobulinmoleküle, welche H- und L-Ketten beider Elternzellen enthalten würden.
Günstige Milz/Myelomzellverhältnisse liegen bei 1:1 bis 10:1 (Köhler et al., 1976; Goding, 1980; Fazekas de St. Groth et al., 1980).
Spontanfusionen, wie sie z.B. bei Ei und Samenzelle, bei Osteoklasten und Fremdkörperriesenzellen vorkommen, sind bei nicht transformierten Somazellen relativ seltene Ereignisse (Barski et al., 1961). Bei in vitro Versuchen geht aus 10^6 - 10^7 Zellen eine Hybridzelle hervor, während sich die Fusionsrate auf das 10-100fache bei Polyäthylenglykol (PEG) vermittelten Fusionen steigern läßt (Yelton et al., 1980).

Das zunächst als Hybridogen verwendete Sendaivirus (Harris et al., 1965; Neff et al., 1968) brachte technische Schwierigkeiten mit sich und es ließen sich darüberhinaus bei einigen Zellarten, so auch bei Mäusemyelomzellen, aufgrund fehlender Sendaivirusrezeptoren (Yelton et al., 1980) nur schwer Hybridome erzeugen. Klebe und Mancuso (1981) untersuchten 118 membranaktive Reagenzien in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen auf ihre Fähigkeit, Zellfusionen zu begünstigen. Sie fanden darunter 20, die einen ähnlichen positiven Effekt zeigten wie PEG, z.B. Polyvinylpyrrolidone, Polyvinylalkohole und Polyglyzerole. In Bezug auf PEG ($HO-(CH_3-CH_2)_n-OH$) stellten sie fest, daß dem Molekulargewicht in den Grenzen von 400 bis 3000 keine Bedeutung zufällt. Einflußreich dagegen ist die Konzentration der PEG-Lösung, die 50%ig die geringste Zytotoxizität und die beste Fusionsrate bewirkt. Die Arbeitstemperatur hatte nur eine geringe Auswirkung auf die Hybridomausbeute. Sie bevorzugten, das Hybridogen bei Raumtemperatur einwirken zu lassen.

Über den Ablauf der Fusion und die Rolle des PEG als Vermittler ist nur wenig bekannt. Die Zellfusion wird in 3 Stufen unterteilt (Knutton et al., 1979):

1. Zellagglutination: Unter Einwirkung des hydrophilen PEG schrumpfen die Zellen, da Wasser aus der Hydrathülle der Glykoproteine an der Zelloberfläche und der Glykokalix verdrängt wird (Fried et al., 1971). Dadurch entsteht die Möglichkeit zu sehr engem Zellkontakt bzw. zur Adjunktion und Agglutination. Dieser Schritt ist temperaturunabhängig.
2. Membranfusion: Dieser temperaturabhängige Schritt findet erst statt, wenn das PEG entfernt worden ist. Unter dem Elektronenmikroskop lassen sich Zytoplasmabrücken zwischen den Zellen erkennen.
3. Zellschwellung: Nachdem die Zellmembranen verschmolzen sind, nimmt die nun heterokaryonte Zelle eine größere ovoide Gestalt an. Die Vorgänge, die zu den Permeabilitätsänderungen der Zellmembran führen, sind bei PEG-Fusionen noch nicht bekannt. Bei Fusionen mit Sendaivirus treten Änderungen in der Na^+ und Ka^+ -Ionenpumpe auf.

Trotz Fusionsvermittler stellt eine Hybridomzelle/10^5 Zellen ein relativ seltenes Ereignis dar, so daß die Kultur sehr bald von unfusionierten Tumorzellen überwuchert wäre. Diese Schwierigkeit kann durch die von Littelfield (1964) entwickelte Selektionsmethode, die nur Myelomzell-Milzzellhybriden ein Überleben ermöglicht, überwunden werden (Abb. 1): Der Folsäureantagonist Aminopterin (A) blockiert die Nucleinsäuresynthese durch Hemmung der bei der de novo Synthese des Purinringes ablaufenden Transformylierungsreaktion (Buddecke, 1970). Die Zelle kann jedoch, wenn sie die Enzyme Thymidinkinase (TK) und Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase (HGPRT) besitzt, einen "Behelfsweg" zur DNA-Synthese beschreiten, indem sie beim Abbau

entstehende freie Purine, sowie endogenes Hypoxanthin und Thymidin, wieder zu den entsprechenden Nukleotiden resynthetisiert. Um diesen Weg auch noch zu unterbrechen, kann man unter den Myelomzellen solche Zellen selektieren, die $HGPRT^-$ oder TK^- sind: HGPRT katalysiert den Einbau von Azaguanin (Ag) in die DNA, worauf der Zelltod folgt. Ag-resistente Zellen sind somit $HGPRT^-$. Ag-resistente Myelomzellen können also in einem Medium aus Aminopterin, Thymidin und Hypoxanthin (HAT-Medium) nicht überleben. Fusioniert man sie jedoch mit Milzzellen (sie sind $HGPRT^+$ und TK^+, sterben jedoch in der Zellkultur nach kurzer Zeit ab), so kann die Hybridzelle den "Behelfsweg" wieder benutzen und überlebt im HAT-Medium. Andere Hybride, also Myelom-x Myelomzell- oder Milz-x Milzzellhybride überleben nicht.

Die Bedeutung eines sogenannten "feeder-layers" sowohl unmittelbar nach der Fusion als auch beim Klonierungsvorgang, wird von vielen Autoren herausgestellt. De St. Groth et al. (1980) verwenden Makrophagen, Galfré et al. (1977) unfusionierte Milzzellen zur Aufzucht von Hybridomen. Zur Klonierung wird der Gebrauch von Thymozyten (Lehnhardt et al., 1978; Hellström et al., 1980), von normalen Milzzellen (Levy et al., 1978), von Peritonealzellen (Hengartner et al., 1978) und Fibroblasten (Kennett et al., 1978) beschrieben. Ihre Funktion liegt vermutlich sowohl in der Phagozytose von Zelldetritus als auch in der Bildung von proliferationsfördernden Proteinen (Goding, 1980).
Ein großes technisches Problem stellt die Instabilität einiger Hybridome dar, die von Fusion zu Fusion unterschiedlich sein kann (Köhler, 1980). Sie hängt sowohl mit Chromosomenverlusten der mit einem annähernd vierfachen Chromosomensatz ausgerüsteten Zelle (Köhler et

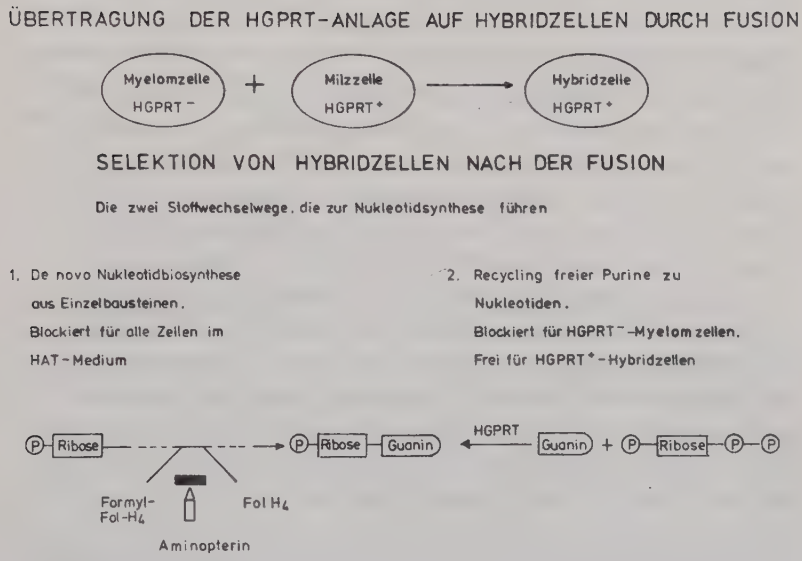

Abb. 1: Übertragung der HGPRT-Anlage auf Hybridzellen durch Fusion und Selektion von Hybridzellen nach der Fusion.

al., 1978) als auch mit dem Überwuchern durch nicht-produzierende Kolonien (Gerhard et al., 1978) zusammen.

Durch möglichst frühzeitiges und wiederholtes Klonieren antikörperproduzierender Hybridome lassen sich diese negativen Erscheinungen verringern. Kloniert wird im sog. Soft-Agar-Verfahren (Coffino et al., 1972), mit der Endpunktverdünnungsmethode ("limiting dilution", Lefkovits et al., 1979) oder mit der "mini-cloning"-Prozedur (Minna et al., 1981).
Typische, in Hybridomzellkulturen zu erzielende Antikörperkonzentrationen in Kulturüberständen, liegen im Bereich von 10-100 µg/ml (Secher, 1980). Um maximale Konzentrationen zu erhalten, kann man die Kultur vollständig dicht wachsen lassen und den Überstand nach eingetretenem Zelltod gewinnen (Goding, 1980). Sind höhere Antikörpertiter nötig, so können die Immunglobuline des Kulturüberstandes durch Ammoniumsulfatpräzipitation angereichert werden (Fey et al., 1976) oder die Hybridome in vivo als Subcutan- oder Ascitestumoren angezüchtet werden, wobei das Serum bzw. die Ascitesflüssigkeit der Hybridomträger große Konzentrationen monoklonaler Antikörper enthalten (Yelton et al., 1980).
Bei der Transplantation von Hybridomen muß auf die Histokompatibilität von Transplantat und Empfänger geachtet werden (Katz et al., 1976). Zwei bis vier Wochen nach der Injektion von ca. 10^7 Zellen (Köhler et al., 1976) läßt sich ein Tumorwachstum erzielen. Die Antikörperkonzentrationen im Serum bzw. Ascites sind 100 bis 1000fach höher als im Kulturüberstand und liegen bei 3 bis 15 mg/ml (Goding, 1980). Die Ascitesproduktion kann durch die i.p. Gabe von 2,16,10,14-Tetramethylpentadecan (Prestane^R), welche mindestens 3 Wochen vor der Transplantation zu erfolgen hat, gefördert werden (McKearn, 1980). Auch die

Verabreichung von Antilymphozytenseren (McKearn, 1980), eine leichte Ganzkörperbestrahlung (350-400 rad) (Köhler et al., 1976) oder die Verwendung von Freund'schem Adjuvans (Tung et al., 1976) wird empfohlen, um einerseits die Rate der Tumorträger zu erhöhen und andererseits eine hohe Antikörperkonzentration zu erreichen. Serum oder Ascites von Tieren, die IgM-produzierende Hybridome tragen, weisen im Vergleich zu solchen, die IgG-produzierende Hybridome tragen, aus noch ungeklärtem Grund relativ niedere Antikörpertiter auf (Köhler et al., 1976).

III. Nachweis tumorassoziierter Antigene mittels monoklonaler Antikörper

Die Hybridomtechnologie erfordert Methoden, mit welchen zahlreiche Kulturüberstände in kürzester Zeit und verläßlich auf ihren Antikörpergehalt untersucht werden können, um daraufhin die Hybridome erwünschter Spezifität selektieren zu können. Verschiedene "screening"-Methoden stehen zur Verfügung, die die Antikörperbindung an die Oberfläche der Targetzelle erkennbar machen.

So wurde der Radioimmunoassay mit ^{125}J- (Fischer et al., 1980; Bechtol, 1980) oder ^{3}H-markierten Immunglobulinen (Kummer et al., 1981) für die Hybridomtechnologie adaptiert. Indirekte Immunfluoreszenzmethoden (Goding, 1976) eignen sich insbesondere dann, wenn ein "Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (FACS) zur Verfügung steht (Parks et al., 1979; Posner et al., 1982).
Der in der Serodiagnostik bereits weit verbreitete "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) hat mit alkalischer Phosphatase (Suter et al., 1980) oder Meerrettichperoxidase konjugiertem zweiten Antikörper (Douillard et al., 1980; Landsdorp et al., 1980; Posner et al., 1982) Zugang zu den "screening"-Methoden gefunden. Durch photometrische Auswertung lassen sich die Versuchsergebnisse quantifizieren.
Der ELISA-Test kann an Monolayerkulturen (Pateraki et al., 1981) oder auch an fixierten und unfixierten frischen Zellpräparationen durchgeführt werden (Douillard et al., 1980). Der große Vorteil enzymkonjugierter Antikörper, im Vergleich zu fluoreszierenden oder radioaktiv markierten Antikörpern, liegt in ihrer einfachen Handhabung (Nakane et al., 1967) bezüglich Herstellung, Verarbeitung, Auswertung und Konservierung der Präparate. Spezifität und Sensitivität dieser Tests sind mit dem RIA (Suter et

al., 1980) oder mit der Immunofluoreszenztechnik (Nakane et al., 1966) vergleichbar. Unter Berücksichtigung der Sicherheits- und Umweltbelastungsprobleme, welche RIA-Methoden mit sich bringen, ist der ELISA-Technik des weiteren der Vorzug zu geben. Je nachdem, ob die Färbung lichtmikroskopisch, elektronenmikroskopisch oder photometrisch ausgewertet werden soll, werden verschiedene Substrate verwendet (3,3'-Diaminobenzidin: Dubois-Dalcq et al., 1977; Landsdorp et al., 1980; 3-Amino-9-Äthylcarbazol: Graham, 1965; Nexø,1977; ortho-Phenylendiamin: Posner et al., 1982).

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper (MkAk) sind bislang an folgenden Tumoren des Menschen assoziierte Antigene nachgewiesen worden: Lungenkarzinomen (Minna et al., 1981), Kolorektalkarzinomen (Herlyn et al., 1977; Koprowski et al., 1979), Melanomen (Koprowski et al., 1978; Herlyn et al., 1979; Herlyn et al., 1980; Jeh et al., 1979; Carrel et al., 1980), Gliomen und Neuroblastomen (Kennet et al., 1979; Schnegg et al., 1981a; Seeger et al., 1981; Carrel et al., 1982; Sikora et al., 1982; de Muralt et al., 1982).

Um die Art der Antigene näher zu charakterisieren, beschreiten verschiedene Arbeitsgruppen unterschiedliche Wege. Wikstrand et al. (1982) stellten MkAk gegen fetale menschliche Hirnzellen her und wiesen an Tumoren neuroektodermalen Ursprungs (Gliomen, Melanomen, Neuroblastomen) Antigene nach, die auch von fetalem Hirn, Leber, Milz exprimiert werden, jedoch nicht von Tumoren anderer Keimblätter. Kennet et al. (1979) selektierten einen Hybridomklon, dessen Antikörper gegen eine Neuroblastomzellinie, vom Menschen stammend, gerichtet war und mit 5 weiteren Neuroblastomlinien, einem Retinoblastom, einem Gliom und mit fetalem Hirngewebe kreuzreagierten. Carrel et al. (1982) beschrieben fünf monoklonale Melanom-

antikörper, die mit Gliomen und Neuroblastomen kreuzreagierten. Seeger et al. (1981) wiesen unter Verwendung zweier monoklonaler Melanomantikörper gemeinsame Antigendeterminanten an Gliomen, Melanomen, Neuroblastomen und verschiedenen fetalen Geweben nach. Sie konnten keine Reaktionen mit adultem Hirn, Karzinom- oder Teratomzelllinien feststellen. Ähnliche Ergebnisse erzielten Herlyn et al., (1980).

Die Antigenexpression kann innerhalb einer Tumorlinie erheblich variieren. Yeh et al. (1981) konnten aus Melanomlinien Subklone isolieren, die mit einem bestimmten MkAk nicht mehr reagierten, wohl aber noch mit anderen. Sie vermuteten daher, daß dem gemischten Charakter einer Tumorzellpopulation nicht zellzyklusbedingte, sondern genetische Mechanismen, wie Chromosomen- oder Genmutationen zugrunde liegen. Bigner et al. (1981) beschrieben die genotypische und phänotypische Heterogenität verschiedener permanenter Gliomzellinien. Die Erkenntnis, daß verschiedene Tumorcharakteristika unabhängig voneinander Veränderungen unterworfen sind, ist hinsichtlich der Anwendung MkAk in diagnostischer und therapeutischer Hinsicht von grundlegender Bedeutung. Auch Goding (1980) erwähnt, daß MkAk für bestimmte Zwecke zu spezifisch sein können, insbesondere bei Vorgängen, die auf Kreuzreaktionen, wie Komplementbindung oder Präzipitationen beruhen. Eine Kombination von Antikörpern gegen mehrere verschiedene Antigene kann in solchen Fällen erfolgversprechend sein (Yeh et al., 1981).

Tumortherapieversuche mit konjugierten und reinen MkAk werden von Herlyn et al. (1980) für das Kolorektalkarzinom der Maus, von Bernstein et al. (1980) für die Leukämie der Maus und von Ghose et al. (1981) für intracerebrale Neuroblastomtransplantate der Maus beschrieben.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Material und Methoden

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Balb/c Mäuse sowie Fischer-Ratten (F344) beiderlei Geschlechts. Sowohl die Ratten als auch die Mäuse waren reine Inzuchtlinien, wurden unter gleichen Bedingungen gehalten und erhielten als Standarddiät Altromin^{R} und Wasser ad libitum.

2. Zellmaterial

2.1. Zellkulturen

2.1.1. Permanente Gliomzellinien

Die im Mittelpunkt dieser Untersuchungen stehenden Ratten-Gliomzellinien wurden 1978 bzw. 1979 aus N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff induzierten Hirntumoren bei Fischer-Ratten etabliert (Stavrou et al., 1980). Folgende, durch den Nachweis gliaspezifischer Antigene (S-100, GFAP) charakterisierte Gliomzellinien, fanden Verwendung:

a) 79FR-G-41 : Isoliert aus einem pleomorphen Astrozytom (Astrozytoma II) der rechten Großhirnhemisphäre.
b) 78FR-G-219: Isoliert aus einem pleomorphen Gliom der linken Großhirnhemisphäre.
c) 78FR-G-284: Isoliert aus einem in der Pons lokalisierten Mischgliom II.
d) 78FR-G-299: Isoliert aus einem in der linken Großhirnhemisphäre lokalisierten Astrozytom I-II.
e) 78FR-G-344: Isoliert aus einem Mischgliom II der rechten Großhirnhemisphäre.

Diese Gliomzellinien wurden auf Nunc^{R}-Plastikflaschen kultiviert, mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco 430-2100) gefüttert, welches 10% fetales Kälberserum (FKS), 100.000 IE Penicillin G, 0,1 g Neomycin und 0,1 g Streptomycin pro Liter enthielt. Die Zellen wurden im geschlossenen System bei 37°C bebrütet und je nach Wachstumsgeschwindigkeit durch Trypsinierung im Verhältnis 1:10 bis 1:50 geteilt.

2.1.2. Myelomzellinie

Alle Fusionen wurden mit der Balb/c-Mäusemyelomzellinie X63-Ag8.653 (Kearney et al., 1979) durchgeführt. Diese ist ein Subklon von X63-Ag8, der keine nachweisbaren Mengen an λ - und k -Ketten synthetisiert, die die Ursprungslinie noch sezerniert. X63-Ag8.653 ist somit eine sogenannte "non-producer"-Myelomzellinie. Ihre Zellen besitzen 53 Chromosomen, sind azaguaninresistent (Ag), negativ bezüglich des Enzyms Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT^{-}) und damit sensitiv gegenüber HAT-Selektivmedium.
Die Myelomzellen wurden auf Nunc^{R}-Plastikflaschen kultiviert, mit Earle's Minimum Essential Medium (EMEM) gefüttert, welches 10% fetales Kälberserum, 15 mg Azaguanin, 100.000 IE Penicillin G und 0,1 g Neomycin pro Liter enthielt. Die Vitaminkonzentration wurde durch den Zusatz von 10 ml der Vitaminlösung IV (Seromed 0373) pro Liter Medium verdoppelt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 im offenen System bebrütet und im Verhältnis 1:2 bis 1:10 geteilt.
Zur Fusion wurden nur Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet.

2.1.3. Hirn- und Nierenzellkulturen

Neugeborene Fischer-Ratten wurden durch Dekapitation getötet. Das gesamte Gehirn und beide Nieren wurden unter sterilen Kautelen entnommen.
Die Hirnzellkultur wurde nach der mechanischen Gewebe-Dissoziationsmethode (Paul, 1980), die Nierenzellkultur nach der Explantationsmethode (Paul, 1980) in Plastikflaschen angelegt. Als Anzuchtmedium diente M199, das dieselben Zusätze wie Dulbecco's Modified Eagle Medium enthielt. Bebrütet wurde im geschlossenen System bei 37°C. Zellen aus der 2. Passage wurden für die Versuche verwendet.

2.1.4. Mäuseperitonealzellen ("feeder-layer"-Zellkultur)

3 bis 7 Tage vor ihrer Tötung wurden adulte Balb/c Mäuse mit 0,7 ml Thioglycollate Medium 10% (Difco 0256-02-9) intraperitoneal vorbehandelt (Schimmelpfeng et al., 1980). Das Thioglycollate Medium sollte, um eine maximale Zellausbeute zu erhalten, vor der Anwendung 2 bis 4, mindestens jedoch einen Monat, bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden (Mishell, 1980).
In Äthernarkose wurden die Tiere durch Genickdislokalisation getötet, in 70%igen Äthanol getaucht und die Bauchhaut abgezogen. Das Abdomen wurde sorgfältig ausgespült, in dem 5 ml eines Standardmediums durch eine weitlumige Kanüle (0,9 x 3,8) mittels Einwegplastikspritze mehrmals schonend, um Blutbeimengungen zu verhindern, aufgesaugt und eingespritzt wurden. Die Spülflüssigkeit wurde in gekühlte (0°C) konisierte Glasröhrchen transferiert, mit 2 ml kaltem FKS (4°C) unterschichtet und 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert. Die Konzentration wurde auf 1 - 2 x 10^6 Zellen/ml eingestellt. Pro Vertiefung einer Mikroplatte wurden 10 µl, pro Vertiefung einer (24)-

Linbroplatte wurden 100/ul und auf eine kleine 20 cm^2-Plastikflasche wurden 1 ml dieser Zellsuspension gegeben.

3. Konservierung von Zellen und Hybridomprodukten

Zum Einfrieren der Zellen wurden dem jeweiligen Grundmedium 20% FKS, 10% Dimethylsulfoxyd (DMSO, Serva Heidelberg Nr. 20385) zugesetzt. 10^5 - 10^7 Zellen wurden in 1 ml dieses Einfriermediums aufgenommen und 4 Stunden bei 4°C gelagert und dann bei -90°C tiefgefroren (Ashwood-Smith, 1961). Die Zellen wurden schockartig aufgetaut und zunächst mit Medium/20% FKS gefüttert. Die Anzucht von Hybridomen erfolgte stets auf 24-Linbroplatten unter Verwendung eines "feeder-layers".
Sobald sich die Zellen am Grunde des Gefäßes abgesetzt hatten (1-2 Std.), wurde das Medium gewechselt, um das DMSO zu entfernen.
Zur Konservierung von Kulturüberständen und Ascitesflüssigkeit wurden diese in der Regel mit 0,02% Natriumazid (NaN_3) versetzt und bei 4°C aufbewahrt (Goding, 1980). Ascitesflüssigkeit wurde auch in kleinen Mengen bei -20°C eingefroren.

4. Immunisierungen

Weibliche Balb/c Mäuse wurden mit der Gliomlinie 79FR-G-41 immunisiert.
Die Tiere erhielten zur Grundimmunisierung 1 bzw. 4,5 x 10^6 mit 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS, Sigma; Lemonnier et al., 1977) modifizierte Zellen (Stavrou et al., 1981). Zur Herstellung einer 10 mM TNBS-Lösung wurden 0,2932 g TNBS in 100 ml eines 0,05 M Natriumphosphatpuffers (pH 7,4) gelöst. Mechanisch geerntete Zellen aus Monolayerkulturen wurden 3 x in PBS-A gewaschen, auf eine Konzentration von 5 x 10^7/ml PBS-A eingestellt und mit 1 ml vorgewärmter TNBS-Lösung/5 x 10^7 Zellen versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C wurden die Zellen solange mit PBS-A gewaschen, bis der Überstand nicht mehr gelb war.

Zur Boosterung, nach einer Ruhezeit von mindestens 3 Monaten, erhielten die Tiere 1 - 4 x 10^6 native Zellen intraperitoneal. Diese wurden durch schonende Trypsinierung aus Monolayerkulturen gewonnen, in PBS-A gewaschen und suspendiert.
Einzelheiten der Immunisierungsprotokolle können den Tabellen 1 und 2 entnommen werden.

5. Zellfusion

Die Zellfusion wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Davidson et al. (1976), Galfré et al. (1977) sowie Fazekas de St. Groth et al. (1980) durchgeführt (Abb. 2).
Zur Fusion gebracht wurden unter Einwirkung einer 50%igen (v/v) PEG 4000-Lösung Mäusemilzzellen (sensibilisiert gegen 79FR-G-41) und Mäusemyelomzellen X63-Ag8.653.

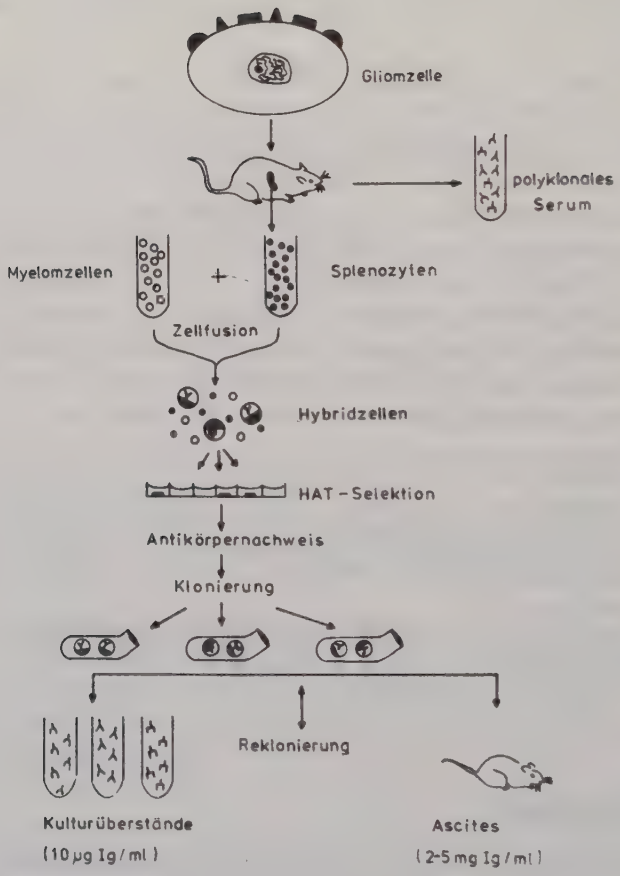

Abb. 2: Produktion monoklonaler Antikörper mit Hilfe der Hybridzelltechnik

Vorbereitung der Myelomzellen:

24 Stunden vor der Ernte wurden die Kulturen 1:2 geteilt und mit EMEM/20% FKS gefüttert. Nur Zellen in logarithmischer Wachstumsphase und optimaler Lebensfähigkeit wurden verwendet.
Nach mechanischem Abrütteln der Zellen wurden ca. 10^7 Myelomzellen in 10 ml serumfreien RPMI/Na-EDTA gesammelt und ein weiteres Mal im selben Medium gewaschen. Der Zellsuspension wurden 0,5 ml für die HAT-Testreihe entnommen. Das RPMI 1640 (Flow Lab. Nr. 10-601-22) Medium enthielt stets einen Zusatz von 3,5 ml einer 1%igen Na-EDTA-Lösung.

Vorbereitung der Milzzellen:

Zwei immunisierte Mäuse wurden in Äthernarkose durch Genickdislokalisation getötet, in Äthanol getaucht und ihnen unter sterilen Bedingungen die Milzen entnommen. Diese wurden in kleine Stückchen geschnitten und unter stetem Zutropfen von 8 ml EMEM/10% FKS mittels Stempel durch ein Sieb (Porenweite 60 µ) gedrückt. Aus der gewonnenen Zellsuspension setzten sich in einem konisierten Zentrifugenröhrchen während 3 - 5 min größere Milzstückchen ab, der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen transferiert, mit 2 ml kaltem FKS (4°C) unterschichtet und 5 min bei 800 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 2 ml Ammoniumchlorid (NH_4Cl, 0,8%ig) während einer Minute leicht aufgeschüttelt, um die Erythrozyten zu hämolysieren, dann weitere 6 ml EMEM/10% FKS zugegeben und mit 2 ml kaltem FKS (4°C) unterschichtet. Nach der Zentrifugation (5 min, 800 g) wurden die Zellen in 10 ml serumfreien RPMI/Na-EDTA resuspendiert, gezählt und 1 ml (etwa 1 x 10^7 Zellen) zum späteren Gebrauch als "feeder-layer" entnommen. Die bei

diesem Schritt beginnende Zellverklumpung wurde als nicht störend beurteilt. Eine weitere Zentrifugation schloß sich an.

Fusion:

10^7 Myelomzellen in 10 ml serumfreien RPMI/Na-EDTA suspendiert, wurden auf das Milzzellenpellet mit 10^8 Zellen gegeben, gemeinsam suspendiert und zentrifugiert (8 min, 900 g).
Das Pellet wurde sorgfältig möglichst trocken gesaugt und mit einer 50%igen Polyäthylenglykollösung versetzt, welche aus 1 Volumenteil serumfreiem RPMI mit Na-EDTA und 1 Volumenteil geschmolzenem sterilem PEG (MG 4000, Merck Darmstadt Nr. 9727) bestand (Schreier et al., 1980). Die Fusionslösung hatte einen pH von 8,4. Während des Fusionsexperimentes wurde folgender Zeitplan eingehalten:

	Einwirkzeit der PEG-Lösung (min)
1. Pellet + 1 ml PEG/RPMI/Na-EDTA-Lösung 1 x suspendieren	1
2. + 1 ml serumfreies RPMI/Na-EDTA zutropfen	2
3. + 2 ml serumfreies RPMI/Na-EDTA zutropfen	3
4. + 4 ml RPMI/Na-EDTA/20% FKS	5
5. Zentrifugation 8 min, 700 g	

Die Zellen wurden in 10 ml RPMI/Na-EDTA/20% FKS suspendiert und eine Stunde bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Im Anschluß an die Stabilisationszeit wurden die Zellen in 200 ml HAT-Medium aufgenommen, die "feeder-layer"-Zellen hinzugegeben und 2 ml dieser Suspension pro Loch

mehrer (24)-Linbroplatten ausgesät. Das HAT-Hybridom-Selektionsmedium bestand aus Earle's Minimum Essential Medium, dem pro Liter 10 ml einer 0,04 mM Aminopterin-vorratslösung (Sigma,A2255), 10 ml einer gemeinsamen 10 mM Hypoxanthin-1, 6 mM Thymidinvorratslösung (Sigma, H 9377, Sigma, T 5250), 100.000 IE Penicillin G, 0,1 g Streptomycin, 10 ml der Vitaminlösung IV (Seromed, München, Nr. 0373) und 20% FKS zugesetzt wurden. Eine HAT-Kontrollreihe mit unfusionierten Myelomzellen wurde angelegt.
Die Platten wurden bei 37°C, 5% CO_2 in einer mit Feuchtigkeit gesättigten Atmosphäre bebrütet. Nach 3 Tagen und weiterhin 2 x wöchentlich wurde das Medium durch frisches HAT-Medium ersetzt. Nach 5-7 Tagen war ein deutliches Koloniewachstum zu erkennen. Ab dem 10. Tag konnten die ersten Kulturüberstände getestet werden und Kolonien isoliert werden. Nach 2 Wochen, als die Hybridome stabil wuchsen und alle Myelomzellen der HAT-Testreihe zugrunde gegangen waren, wurde das HAT-Medium zunächst durch aminopterinfreies HT-Medium, dann durch normales Hybridomerhaltungsmedium ersetzt. Letzteres setzt sich wie das HAT-Medium zusammen, jedoch fehlen die Aminopterin-Hypoxanthin-Thymidinzusätze. Bei gutem Wachstum der Hybridomzellen konnte der Serumanteil im Medium auf 10% gesenkt werden.

6. Nachweisverfahren gliombindender Antikörper

6.1. Indirekte Immunperoxidasefärbung (IPF)

Diese Färbung wurde als erste "screening"-Methode nach der Fusion eingesetzt, um nur die Hybridome zu isolieren, die gliombindende Antikörper sezernieren. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden Monolayerkulturen auf Terasakiplatten angelegt (Pateraki, 1981; 500-1000 der zu untersuchenden Zellart/Loch) und im semikonfluenten Zustand verwendet. Die Zellen wurden mit temperiertem PBS-A einmal gewaschen und 5 min mit Methanol:Aceton 1:1, 4°C, fixiert. Nach der Lufttrocknung (mindestens 10 min) wurden 20/ul des ersten Antikörpers in Form von Hybridomkulturüberstand in jedes Loch gegeben und in der feuchten Kammer oder in zugedecktem Zustand bei 37°C eine Stunde inkubiert. Sechsmaliges Waschen mit zwischenzeitlicher Inkubation in PBS-A (10 - 20 min) schloß sich an. Der zweite Antikörper, ein mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin (R-anti-M-HRPO, Dako) wurde in PBS-A/5% FKS 1:100 verdünnt und je 20/ul pro Vertiefung aufgetragen. Die anschließende Inkubations- und Waschprozedur entsprachen dem ersten Teil der Färbung.
Um die Antigen-Antikörperreaktion sichtbar zu machen, wurde das Substrat nach Nexø (1977) verwendet: 20 mg 3-amino-9-äthyl-Carbazol (Sigma) wurden in 5 ml Dimethylformamid (Merck) gelöst, in 95 ml 50 mM Acetatpuffer, pH 5, aufgenommen, filtriert und kurz vor Gebrauch mit 50/ul H_2O_2, 30%ig, versetzt.
Das Substrat wirkte solange ein, bis ein deutlicher Kontrast positiver und negativer Zellen zu erkennen war und die "background"-Färbung noch nicht deutlich hervortrat. Die Platten wurden unter fließendem deionisiertem Wasser gewaschen und mit Kaiser's Glyceringelatine eingeschlossen.

Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Dabei wurden 4 Intensitätsgrade unterschieden: stark positive, positive, schwach positive und negative Reaktion.
Als negative Kontrolle diente Kulturüberstand von X63-Ag8.653, als positive Kontrolle Balb/c-Serum aus dem jeweiligen zur Fusion verwendeten Tier in einer Verdünnung von 1:100. Indem der erste Antikörper weggelassen und durch PBS-A/5% FKS ersetzt wurde, konnten die Testzellen auf solche Determinanten untersucht werden, die mit dem zweiten Antikörper alleine reagieren könnten und so falsch positive Ergebnisse verursachen würden. Färbungsvergleiche wurden durchgeführt mit Zellen, deren eventuell vorhandene endogene Peroxidase zuvor durch 30minütige Inkubation mit Methanol + 0,5% H_2O_2 (Landsdorp, 1980) blockiert worden war.

6.2. Indirekte Immunofluoreszenz (IF)

Die zu untersuchenden Zellen wurden 2 bis 3 Tage vor Versuchsbeginn auf Lamellen ("cover slips") in "Leightontubes" als Monolayerkultur angelegt.
Es wurden unfixierte Zellen, sowie auf 3 verschiedene Arten fixierte Zellen verwendet:
a) Aceton, 4°C, 3 min
b) Glutaraldehyd, 5,25%, 4°C, 5 min
c) Formalin, 6%ig in PBS-A, 21°C, 5 min

Die Zellen wurden mit Hybridomkulturüberständen 30 min bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen, 5 min, wurde die gleiche Inkubationsprozedur für den zweiten Antikörper, ein fluorescinisothiocyanat-konjugiertes Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin (Verdünnungsstufe 1:10, Dako, Sandwich-Technik nach Coons et al., (1957)) wiederholt. Die Auswertung wurde nach Einschluß

in gepuffertem Glycerol vorgenommen. Zum Vergleich dienten Präparate, die mit Myelomzellüberstand inkubiert worden waren.

6.3. ^{3}H-Radioimmunoassay (RIA)

Der RIA wurde entsprechend den Angaben von Kummer et al. (1981) durchgeführt. Es wurden Gliomzellen sowie Hirn- und Nierenzellen neugeborener Fischer-Ratten aus der zweiten Kultivationsstufe verwendet.
Nach einer vorherigen Lebend-Tot-Färbung mit Trypanblau wurden 2,5 x 10^5 Zellen pro Loch einer (96)-Linbroplatte (Greiner, Flachboden) ausgesät. 10 µl der Hybridomkulturüberstände inkubierten 30 min bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen wurden 10 µl des tritiummarkierten Ziegen-anti-Maus-Immunglobulins auf gleiche Weise mit den Zellen inkubiert.
Nach abschließendem dreimaligem Waschen der Zellen wurden diese mittels einer 12-kanaligen Zellsammelapparatur auf Fiberglasfilterstreifen (Schleicher und Schüll, Nr. 6, Dassel) transferiert. Der Filterstreifen wurde auf einer Wärmeplatte getrocknet, in Einzelproben zerschnitten, diese in Toluol-gefüllte Gefäße verteilt und die Radioaktivität im Flüssig-Scintilationsspectrometer (Packard, Warrenville) gemessen.

6.4. Enzyme-linked-immunosorbent assay (micro-ELISA)

79FR-G-41 Zellen wurden auf flexiblen (96)-Mikroplatten (Flow Lab. 76-381-04) als Monolayerkultur gezüchtet und mit kaltem Methanol/Acetongemisch (1:1, 4°C) 5 min fixiert (Suter et al., 1980). Die Durchführung des Versuches er-

folgte nach den Angaben von Posner et al. (1982). Die Zellen wurden mit 20 µl der Kulturüberstände 30 min bei 4°C inkubiert. Dasselbe wiederholte sich nach einem dreimaligen Waschvorgang mit PBS-A/5% FKS mit 50 µl eines 1:100 verdünnten Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulins, das mit Meerrettichperoxidase konjugiert war (R-anti-M-HRPO, Dako). Nach sechs abschließenden Waschungen wurden 100 µl folgenden Substrates zugesetzt:
1 mg/ml ortho-Phenylendiamin (Sigma) wurde in 0,1 M Citratpuffer (pH 4,5) gelöst und unmittelbar vor Gebrauch mit 4 µl/ml einer 3%igen H_2O_2-Lösung versetzt.
Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 492 nm nach 20 min durch das Photometergerät Titertek^R, Multiscanner MC (Flow Lab.).
Als Leerwert für die photometrische Auswertung dienten zellhaltige Testlöcher, die genauso behandelt worden waren wie alle anderen, jedoch der zweite, also peroxidasekonjugierte Antikörper, durch PBS-A ersetzt wurde, so daß auf keinen Fall eine Reaktion mit dem Substrat erfolgen konnte.
Negative Kontrollwerte entsprachen den Extinktionen bzw. Färbungsintensitäten, wie sie bei der Inkubation der Zellen mit Myelomzellkulturüberstand zu erzielen sind.
Als positive Kontrolle wurden Zellen mit Serum von Mäusen inkubiert, welche gegen das Gliom 79FR-G-41 immunisiert worden waren.
Makroskopisch erfolgte die Auswertung, in dem zwischen 4 Intensitätsstufen unterschieden wurde, wobei Stufe 0 der Farbe des Substrates alleine und Stufe 4 der Farbe des Substrates mit R-anti-M-HRPO entsprach. In diesem Fall wurde die Farbreaktion nach 30 min durch Zugabe von 25 µl einer 8 N Schwefelsäure pro Vertiefung gestoppt (Douillard et al., 1980).

7. Klonierung von Hybridomen

Sobald positive Hybridome entdeckt waren, wurden sie dem Klonierungsverfahren nach der Endpunktverdünnungsmethode (Goding, 1980) unterworfen um ein Überwuchern mit nichtproduzierenden Varianten zu verhindern.
Unter Verwendung von Mäuseperitonealzellen als "feederlayer" (Hengartner et al., 1978) wurden von jedem positiven Hybridom Verdünnungsreihen von 10, 3 und 0,5 Zellen pro Vertiefung einer (96)-Mikrotiterplatte (Nunc) ausgesät. Überstände der am besten entwickelten Kulturen wurden erneut in der IPF getestet und die positiven Kolonien diesem Vorgang noch mindestens zweimal unterworfen, so daß nach dreimaliger Klonierung, wenn die Ausbeute annähernd 100% positive Vertiefungen ergab, von jeder Stammkolonie 3 Klone etabliert wurden. Diese wurden dann in größeren Gefäßen vermehrt und von Zeit zu Zeit wieder kloniert,um ihre Antikörperproduktion stabil zu halten.

8. Intraperitoneale Transplantationen von Hybridomen

Stabile, makrophagenfrei wachsende Hybridomklone wurden in einer Konzentration von 10×10^6 Zellen in die Bauchhöhle von Balb/c Mäusen (Kalz und Benacerraf, 1976) transplantiert. Die Mäuse waren mindestens 3 Wochen vor der Transplantation mit 0,5 ml 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan (Prestane^R, Ega-Chemie) i.p. behandelt worden (McKearn, 1980). 6 - 10 Tage nach der Transplantation zeigte sich eine birnenförmige Auftreibung des Leibes. Die Bauchhöhle wurde mit einer weitlumigen Kanüle mit Mandrin punktiert und 4 - 6 ml der Ascitesflüssigkeit gewonnen. Diese wurde zur Fibringerinnung 1 Stunde bei

Raumtemperatur stehen gelassen und dann 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Das flotierende Prestane^{R} wurde abgeschöpft und die reine zellfreie Ascitesflüssigkeit gewonnen.

9. Absorptionsversuche

Für quantitative Absorptionsversuche wurden 100 µl eines unverdünnten NaN_3-konservierten oder frischen Hybridomkulturüberstandes mit einer steigenden Zahl (10^4, 10^5, 10^6, 10^7) von Gliomzellen eine Stunde bei Raumtemperatur und 15 Stunden bei 4°C inkubiert (Bechtol, 1980). Die Zellen wurden von Zeit zu Zeit resuspendiert und nach Ablauf der Inkubationszeit 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe verschiedener Techniken (IPF, micro-ELISA, RIA) auf verbleibende Antikörper untersucht.

10. Anreicherung von Immunglobulinen durch Ammoniumsulfatpräzipitation

Es wurde eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung aus 1000 g $(NH_4)_2SO_4$ ad 1000 ml Aqua dest. hergestellt und mit 30% NaOH auf einen pH von 7.0 - 7.1 eingestellt.
Gleiche Volumina des Hybridomkulturüberstandes und der Ammoniumsulfatlösung wurden gemischt und eine Stunde auf Eis gestellt (Fey et al., 1976). Das Präzipitat wurde 30 min bei 48.000 g bei 4°C ultrazentrifugiert und das Sediment in einer kleinen Menge 2 M Ammoniumsulfatlösung aufgenommen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in PBS-A gelöst, in einen

Dialyseschlauch gefüllt und gegen 0,2 M Barbitalpuffer pH 7,2 - 7,4 dialysiert bis das Außendialysat frei von SO_4^{2-} - Ionen war ($BaCl_2$-Nachweis: 5 ml Außendialysat wird mit 2 N HCl angesäuert und mit 3 Tropfen 10%iger $BaCl_2$-Lösung versetzt. Ein weißer Niederschlag entsteht durch schwerlösliches $BaSO_4$).

11. Agargel Immundiffusionstest

20 µl der durch Ammoniumsulfatfällung auf das 10-fache eingeengten Hybridomkulturüberstände wurden in jedes zweite der peripheren Löcher einer Immundiffusionsplatte (Miles Lab., Inc.) pipettiert. Die dazwischenliegenden Löcher wurden mit PBS-A, das zentrale Loch mit Kaninchen-anti-Maus-IgG bzw. Kaninchen-anti-Maus-IgM (Miles Lab., Inc.) beschickt (Ouchterlony, 1962). Die Löcher wurden, wenn nötig, 3 - 4 mal nachgefüllt. Nach 24 bis 48 Stunden waren deutliche Präzipitationslinien zu erkennen.

12. Immunelektrophorese

Zehnfach konzentrierte Kulturüberstände wurden mit Hilfe der Immunelektrophorese auf Anwesenheit von Mäuse-IgG und Mäuse-IgM untersucht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1,5% Agarose (reinst, Serva, Heidelberg), die in Diäthylbarbiturat-Acetat-Puffer gelöst war. Der Puffer bestand aus 0,03 M Barbital-Natrium (Serva, Heidelberg) und 0,065 M Natrium-Acetat. Nach der pH-Einstellung auf 8,2 wurde 1,5 g Agarose in 100 ml verdünntem Puffer (1 Teil Aqua dest. und 2 Teile Puffer) gelöst und autoklaviert.

Als Antiserum diente im Kaninchen hergestelltes Anti-Maus-IgG (Miles-Jeda Ltd., Elkard, Ind. USA). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte entsprechend der Methode von Grabar und Williams (1952) in einer Flachbettkammer (FBE 3000, Fa. Pharmacia, Freiburg) mit einer Stromflußdauer von 2 Stunden. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Gele in physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen. Die danach auf Filterpapier ausgetrockneten Präparate wurden 5 min in 2%iger Essigsäure fixiert, dann 5 min in 0,5%iger Amidoschwarzlösung in Methanol/Essigsäure (90 Teile Methanol/10 Teilen 2%iger Essigsäure) gefärbt und anschließend in der Methanol/Essigsäure-Lösung entfärbt, bis sich keine Schlieren mehr bildeten.

II. Ergebnisse

1. Fusionsprotokolle

Es wurden 14 Fusionsversuche mit Myelomzellen der Linie X63-Ag8.653 und Balb/c-Mäusemilzzellen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Die Ausbeute an Hybridomen variierte erheblich (Tab. 1 und 2).
In dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Fusionen Nr. 13 und 14 detailliert beschrieben (Tab. 2). Aus dem Zelleinsatz von 2×10^7 Myelomzellen und 2×10^8 Milzzellen und einer Ausbeute von mindestens 80 Hybridomklonen ergibt sich eine Fusionsrate von mindestens 4×10^{-6}. Die Auswertung der Plattenvertiefungen erfolgte nach dem Prinzip, daß eine Vertiefung mit Hybridomwachstum mindestens eine X63-Ag8.653 x Splenocyt-Hybridzelle enthalten haben muß. Wieviele Hybridzellen tatsächlich entstanden waren, war schwer zu beurteilen, da durch die Handhabung der Kulturplatte Kolonien auseinanderfallen können, sich dann an mehreren Stellen Tochterkolonien bilden und so selbstständig entstandene Hybridzellkolonien vortäuschen könnten, die tatsächlich mit anderen identisch wären. Aus diesem Grunde wurde die Isolation beschränkt auf eine Kolonie pro Vertiefung, um sicher zu gehen, daß jedes Hybridom auf die Fusion mit einer anderen Milzzelle zurückzuführen ist.
Als Besonderheit bei beiden Fusionen ist zu erwähnen, daß die Milzen der Tiere stark follikulär hyperplastisch waren. In den Zellsuspensionen kam es bei der Zugabe von serumfreiem RPMI/Na-EDTA-Medium zu starken Zellagglutinationen, die sich durch die PEG-Zugabe noch verstärkte.

Die Ausbeute an Hybridomen wird in der Tabelle 3 zusammengefaßt. Etwa drei Tage nach der Fusion konnten die ersten Hybridzellen auf dem Hintergrund der Trümmer unfusionier-

Tab. 1 Einzelheiten aus den Versuchsanordnungen und -ergebnissen zu den Fusionen 1-12 zwischen Mäusemyelomzellen X63-Ag8.653 und Mäusemilzzellen

Fus. Nr.	Antigen	Boo-sterung	Zellzahl	Tag der Fusion nach Boo-sterung	Milz-/ Myelom-zellen	Temp. bei PEG-Ein-wirkung	Feeder-layer	Stabi-lisa-tions-zeit	Anzahl der Vertiefungen mit Hybri-domwachstum am 8. Tag nach der Fusion
1	79FR-G-41C$_2$	3 Wo.	$1x10^6$ TNBS ip $1x10^6$ nativ ip	4.Tg	1:1	21°C	-	45'	40/48
2	79FR-G-41C$_2$	3 Wo.	$1x10^6$ TNBS ip $1x10^6$ nativ ip	4.Tg	10:1	37°C	-	60'	0
3	79FR-G-41C$_2$	4 Wo.	1 $x10^6$ TNBS ip $2,5x10^6$ nativ ip	3.Tg	2:1	21°C	PZ	80'	70/96
4	79FR-G-41C$_2$	3 Wo. 4 Wo.	1 $x10^6$ TNBS ip 1 $x10^6$ nativ ip $3,5x10^6$ nativ ip	3.Tg	2:1	37°C	MZ	30'	0
5	79FR-G-41C$_2$	3 Wo. 4 Wo.	1 $x10^6$ TNBS ip 1 $x10^6$ nativ ip $3,5x10^6$ nativ ip	4.Tg	4:1	21°C	-	60'	52/96
9,10,11	79FR-G-41	4 Wo. 4 Wo.	$4,5x10^6$ TNBS ip $5,5x10^6$ nativ ip 4 $x10^6$ nativ ip	4.Tg	2:1	37°C	PZ	60'	0
12	79FR-G-41	10 Wo.	$4,5x10^6$ TNBS ip 1 $x10^6$ nativ ip	4.Tg	10:1	37°C	MZ	60'	20/96+

+ nach 14 Tagen waren alle Kolonien abgestorben

PZ Peritonealzellen von Balb/c-Mäusen
MZ Milzzellen von Balb/c-Mäusen

79FR-G-41C$_2$ zweite in vivo intracerebrale Passage von 79FR-G-41

Tab. 2 Detaillierte Angaben zu den Fusionen 13 und 14 zwischen Mäusemyelomzellen X63-Ag8.653 und Mäusemilzzellen

		Zellzahl	Verhältnis
Myelomzellinie	X63-Ag8.653	2×10^7	10 : 1
Balb/c Maus ♂	Milzzellen	2×10^8	
Antigen	79FR-G-41		
Immunisierung	Grundimmun.	5×10^6	TNBS mod. Zellen i.p.
	Boosterung	1×10^6	native Zellen i.p. nach 3 Monaten
Tag der Fusion	3. Tag nach Boosterung		
Hybridogen	PEG, Merck 4000, 50 v/v%		
Arbeitstemperatur	Raumtemperatur, auch bei PEG-Einwirkung		
Stabilisation	60', 37°C, 5% CO_2		
Feeder-layer	Balb/c - Mäusemilzzellen		

Tab. 3 Anzahl der entstandenen und Antikörper produzierenden Hybridome des 13. und 14. Fusionsversuches nach dem 8. Tag

	Fus. 13		Fus. 14		total
Plattenvertiefungen mit Koloniewachstum	80/96	(83%)	84/96	(87%)	164
Antikörperpositive Plattenvertiefungen	31/96	(32%)	42/96	(43%)	73
Anzahl der klonierten Kolonien	26		28		54

ter Zellen erkannt werden. Am 8. Tag waren mit Sicherheit alle Myelomzellen der HAT-Kontrolle zugrunde gegangen. In 80 bzw. 84 Vertiefungen (83% bzw. 87%) waren Zellhäufchen z.T. bereits makroskopisch erkennbar (Abb. 3). Aus den Ergebnissen der IP-Färbung mit 79FR-G-41 als Zielzellen ging hervor, daß in 31 bzw. 42 Vertiefungen (32% bzw. 43%) antikörperproduzierende Hybridome enthalten sein mußten.

Abb. 3: Hybridzellkulturen am 1. Tag (a), 4. Tag (b) und 7. Tag (c) nach der Fusion.
(d) Isolierte Kolonie
(e) Etablierte Klonkultur

2. "Screening"-Ergebnisse während der Klonierung

Aus jedem der antikörperpositiven Vertiefungen wurden mehrere Kolonien gepickt und nach einer weiteren Färbung je eine Kolonie weitergezüchtet. Dem Klonierungsverfahren wurden nur 26 bzw. 28 Kolonien unterworfen. Die fehlenden 5 bzw. 14 Kolonien sind bei der Isolierung verloren gegangen.

Die Klonierung wurde in 3 Stufen durchgeführt. In jeder Stufe wurde für jede Kolonie die Anzahl der positiven zur Anzahl der getesteten Proben festgestellt (für Fusion 13 s. Tab. 4), um Rückschlüsse auf die Stabilität ihrer Antikörperproduktion ziehen zu können. Es zeigte sich, daß einige zunächst antikörperpositive Kolonien bereits bei der ersten Klonierung, etwa 14 Tage nach der Fusion, ihre Fähigkeit zur Immunglobulinproduktion verloren hatten. Während bei den meisten Kolonien im Verlaufe der Klonierungen in zunehmendem Maße höhere Raten antikörperpositiver Einzelproben feststellbar waren, stellte sich bei einigen anderen ein gegenteiliger Effekt ein. Es gingen nicht nur immer weniger positive Einzelproben aus der Klonierung hervor, sondern auch stets schwächer reagierende. Um stabil produzierende Klone zu etablieren, wurde darauf geachtet, daß die Ausbeuten innerhalb der jeweiligen Linie bis zur dritten Stufe auf annähernd 100% anstiegen, keinesfalls jedoch abfielen. Im Anschluß an die 3. Klonierungsstufe wurden von den verbleibenden Stammkolonien je drei Klone (C1 - C3) etabliert. Für jede Stufe sind die durchschnittlichen Klonierungsausbeuten in Tabelle 5 dargestellt. Für die Kolonien der Fusion 14 ließen sich die Raten antikörperpositiver Proben von 54% über 66% auf durchschnittlich 70% steigern. Für die Kolonien der Fusion 13 konnten in der 2. Klonierungsstufe sogar durchschnittlich 93% positive Einzelproben erzielt werden, jedoch sank der Wert in der 3. Stufe wieder auf 76% ab.

Tab. 4 Detaillierte Klonierungsergebnisse der Hybridome aus Fusion 13 dargestellt als Quotient

Anzahl der positiven Vertiefungen
Anzahl der getesteten Vertiefungen

Kolonie	1. Stufe	2. Stufe	3. Stufe	Total
A	0/48 (0)			
B	33/48 (69%)	40/48 (83%)	10/42 (23%)	83/138 (60%)
C	46/48 (95%)	40/48 (83%)		
D	46/48 (95%)	48/48 (100%)	46/48 (95%)	140/144 (97%)
E	32/48 (66%)	41/48 (85%)	0/48 (0)	
F	48/48 (100%)	44/48 (91%)	2/ 8 (25%)	94/104 (90%)
G	44/48 (91%)	48/48 (100%)	19/30 (63%)	111/126 (88%)
H	0/48 (0)			
I	0/48 (0)			
J	44/48 (91%)	48/48 (100%)	41/46 (89%)	133/142 (93%)
K	45/48 (93%)	48/48 (100%)	0/ 8 (0)	
L	35/48 (73%)	42/48 (87%)	32/32 (100%)	109/128 (85%)
M	47/48 (97%)	48/48 (100%)	45/48 (94%)	140/144 (97%)
N	34/48 (70%)	45/48 (94%)	25/48 (52%)	104/144 (72%)
O	12/12 (100%)	46/48 (95%)	47/48 (97%)	105/108 (97%)
P	45/48 (93%)	16/16 (100%)	24/24 (100%)	85/ 88 (96%)
Q	38/48 (79%)	48/48 (100%)	19/48 (40%)	105/144 (73%)
R	0/48 (0)			
S	0/48 (0)			
T	38/48 (79%)	24/24 (100%)	15/15 (100%)	77/187 (41%)
U	21/48 (43%)	8/24 (33%)	2/ 9 (22%)	31/ 91 (34%)
V	46/48 (95%)	48/48 (100%)	48/48 (100%)	142/144 (99%)
W	48/48 (100%)	47/48 (97%)	34/36 (94%)	129/132 (97%)
X	47/48 (97%)	47/48 (97%)	48/48 (100%)	142/144 (99%)
Y	28/48 (58%)	48/48 (100%)		
Z	46/48 (96%)	41/48 (85%)	36/42 (86%)	123/138 (89%)
Total	823/1164(70%)	865/928(93%)	493/644(76%)	

Tab. 5 Darstellung der durchschnittlichen Klonierungsergebnisse der Fusionen 13 und 14

	Fusion 13	Fusion 14
1. Klonierungsstufe	70%	54%
2. Klonierungsstufe	93%	66%
3. Klonierungsstufe	76%	70%

3. Spezielle Untersuchungen

3.1. Selektion monoklonaler 79FR-G-41-Antikörper, die normale syngene Rattenzellen nicht erkennen

Um Informationen darüber zu erhalten, inwieweit die monoklonalen Antikörper gezielt mit Gliomzellen und nicht mit normalem Rattengewebe reagieren, wurden zwei verschiedene Nachweisverfahren angewendet: Die indirekte Immunperoxidase-Färbung und der Radioimmunoassay. Indem die Kulturüberstände jedes Klones mit beiden Methoden getestet wurden, sollten methodisch bedingte Interpretationsfehler in der Antigen-Antikörperbindung möglichst gering gehalten werden. Für beide Versuchsanordnungen wurden die gleichen "target"-Zellen verwendet, d.h. parallel zu den zur Immunisierung verwendeten 79FR-G-41 auch Hirn- und Nierenzellkulturen.
In der indirekten Immunperoxidase-Färbung wurden Kulturüberstände aller etablierten Klone, z.T. wiederholt, ge-

testet. Das Reaktionsprodukt des Substrates Aminoäthylcarbazol stellte sich in Form wasserunlöslicher roter Granula dar. Bei der Auswertung unter dem Lichtmikroskop fiel die unterschiedliche Reaktionsweise verschiedener monoklonaler Antikörper mit den Zellen auf. Einige ließen mit der gesamten Zelle eine homogene Färbung zu, andere reagierten nur mit Teilen der Zellkörperoberfläche oder den Ausläufern, während im Zytoplasma der Zelle keine Reaktion erkennbar war (Abb. 4).
Die Fähigkeit, mit der Zelloberfläche nur partiell Bindungen einzugehen, konnte in mehreren aufeinanderfolgenden Färbungen als festes Charakteristikum des betreffenden Hybridomklones bestimmt werden. Der Grad der Reaktion konnte dabei schwach oder stark sein. Alle mit diesen monoklonalen Antikörpern getesteten Zellen, so auch die später bei den Kreuzreaktionsversuchen verwendeten Rattengliome, zeigten in unterschiedlicher Intensität das gleiche Reaktionsmuster (s. Tab. 6).
Von insgesamt 106 getesteten Klonen konnten 21 gefunden werden, die nicht mit normalen Rattenhirnzellen und 18, die nicht mit normalen Rattennierenzellen reagierten. Daraus resultierten 12, die weder die einen, noch die anderen erkannten (Tab. 7), jedoch starke Reaktionen mit den Gliomzellen zeigten.
In dem Radioimmunoassay (RIA) wurde ein Repräsentant jeder Stammkolonie der Klone, die durch die IP-Färbung vorselektiert worden waren, getestet. Von 18 geprüften Klonen zeigten 11 keine Reaktion mit normalen Rattenhirnzellen, 12 keine Reaktion mit normalen Rattennierenzellen. Neun Klone überschnitten sich in diesen beiden Eigenschaften (Tab. 9 und 10), d.h. sie reagierten im Rahmen dieser Versuchsanordnungen selektiv mit Rattengliomzellen. Zum größten Teil korrespondierten die Ergebnisse mit denen der IP-Färbung.

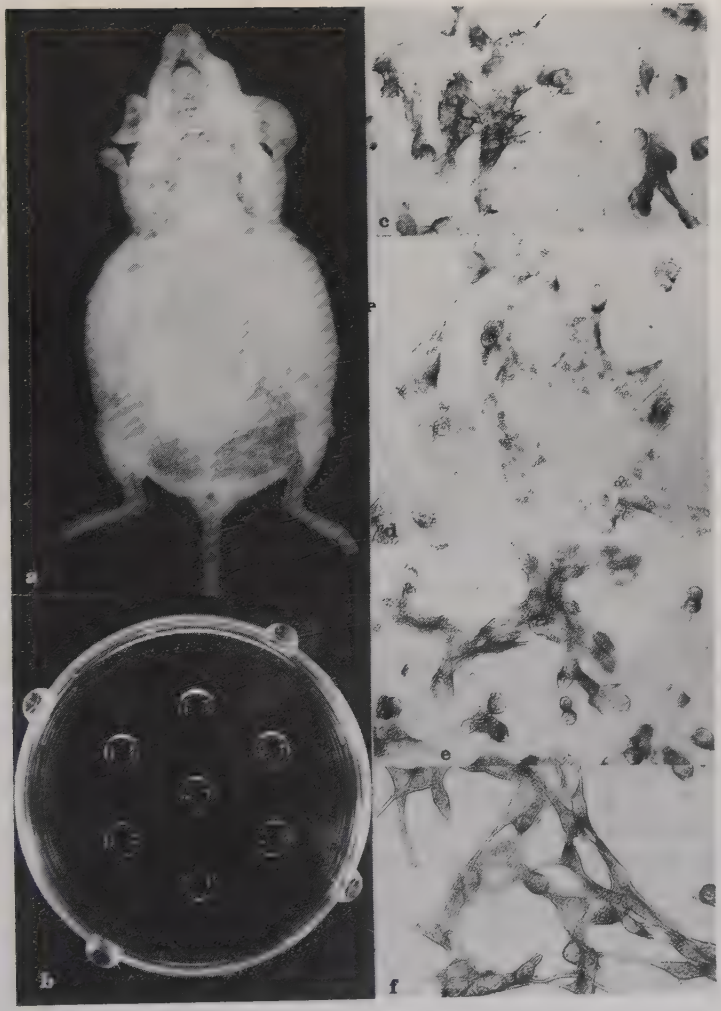

Abb. 4:
(a) Ascites einer Balb/c Maus nach intraperitonealer Transplantation eines Hybridomklones.
(b) Immunodiffusionstest: Im zentralen Loch befindet sich Anti-Maus-IgG. Jedes zweite Loch ist mit zehnfach konzentriertem Klonkulturüberstand beschickt. Es sind deutliche Präzipitationslinien erkennbar.
(c-f) Indirekte Immunperoxidasefärbung: (c) Stark positive Reaktion eines monoklonalen Antikörpers mit Gliomzellen der Linie 79FR-G-41. (d) Auf einzelne Stellen der Zelloberfläche begrenzte Reaktionen eines anderen monoklonalen Antikörpers mit 79FR-G-41-Zellen. (e,f) Kreuzreaktionen monoklonaler 79FR-G-41-Antikörper mit Zellen der Gliomlinien (e) 78FR-G-219 und (f) 78FR-G-299.

Tab. 6 Klone, deren Antikörper nur stellenweise mit der Zelloberfläche der Gliomlinie 79FR-G-41 reagieren

Fusion 13	BC1	KC2	NC3			
	DC2	KC3	TC2+			
	EC2	LC1	TC3			
	GC1+	LC2	VC2			
	GC3	LC3	VC3			
	JC2	MC1				
Fusion 14	AC1+	DC1	KC2	QC1	UC1	XC1
	AC2	DC2	LC1+	QC2	UC2	XC3
	AC3	DC3	MC3	QC3	UC3	ZC1+
	BC1+	HC1	OC1	RC1	VC1	ZC3
	BC2	HC2	OC2	RC2	VC2	
	BC3	HC3	OC3	TC1	VC3	
	CC1	IC1	PC1	TC2	WC1	
	CC2	IC2	PC3	TC3	WC2	
	CC3	IC3			WC3	

Die Antikörper der mit + gekennzeichneten Klone gehen keine Bindung mit normalen Rattenzellen ein

Tab. 7 Klone, deren Antikörper mit dem Rattengliom 79FR-G-41 reagieren, jedoch mit normalen Rattenzellen keine Bindung eingehen (IPF)

Zielzelle	Klone					Negative/getestete
Normale Rattenhirnzellen	13DC2	13XC1	14AC1	14GC1	14PC2	
	GC1	YC1	BC1	KC1	VC1	
	LC1	ZC1	DC1	LC1	WC3	
	NC1		FC3	OC2	XC1	
					ZC1	21/106
Normale Rattennierenzellen	13BC1	13GC1	14AC3	14GC1	14QC2	
	DC1	LC1	BC1	KC1	WC3	
	JC2	NC1	CC1	KC2	XC1	18/106
Normale Rattenhirn- und -nierenzellen	13GC1	14AC2	14GC1	14OC2		
	LC1	BC1	KC1	XC1		
	NC1	FC3	LC1	ZC1		12/106

In Tabelle 9 werden die Ergebnisse aller getesteten Klone aufgelistet. Die "counts per minute" (cpm), die durch die Inkubation der Zellen mit Myelomzell- (X63-Ag8.653) Überstand erzielt wurden, wurden als negativer Kontrollwert den Berechnungen zugrunde gelegt. Positiv wurde erst gewertet ab $cpm_{Probe} = 2 \times cpm_{neg.\ Kontrolle}$

Die Ergebnisse wurden in Form des Faktors

$$cpm_{Probe} \ / \ cpm_{neg.\ Kontrolle}$$

dargestellt und sind so ein Anhaltspunkt für die Stärke der Reaktion. Die mit + bezeichneten Klone in Tabelle 10 stellen Klone dar, deren monoklonale Antikörper in der IP-Färbung und im RIA gleiche Ergebnisse brachten.
Einige Klone haben im Verlauf der Untersuchungen, trotz guten Zellwachstums, ihre Antikörperproduktion eingestellt (Tab. 8). Die Zeitspanne lag zwischen 7 Wochen und 7 Monaten nach der Fusion.

Tab. 8 Klone, die zu verschiedenen Zeiten nach der Fusion die Antikörperproduktion während der in vitro Züchtung eingestellt haben

14 RC3	7 Wochen nach der Fusion
13 QC3	8 Wochen nach der Fusion
13 VC3	8 Wochen nach der Fusion
13 OC1	9 Wochen nach der Fusion
13 PC1	12 Wochen nach der Fusion
14 FC3	7 Monate nach der Fusion

Tab. 9 Reaktivität monoklonaler Antikörper mit Gliomzellen und normalen Rattenzellen (RIA)

Klon	79FR-G-41	Nierenzellen	Hirnzellen
13GC1	6,9	1,4	2,1
LC3	1,9	1,4	2,0
TC2	11,0	1,3	0,9
OC1	1,1	5,6	5,3
VC3	1,6	1,3	0,9
WC1	2,5	1,5	2,2
XC1	2,2	3,8	5,4
YC1	2,1	7,1	5,9
14AC1	16,0	1,8	1,0
BC1	11,3	1,3	0,1
FC3	8,5	1,4	0,9
GC1	12,1	1,9	3,0
KC1	6,5	1,5	1,5
LC1	9,5	1,3	1,1
WC1	1,0	1,2	1,0
WC2	1,6	1,4	3,1
XC2	2,9	1,0	0,8
ZC1	9,0	1,1	0,9

Die Ergebnisse werden als Faktor cpm/cpm$_{X63-Ag8.653}$ dargestellt.
Der Myelomzellüberstand von X63-Ag8.653 ergab mit
der Zielzellinie 79FR-G-41 : 540 cpm
" Nierenzellen: 560 cpm
" Hirnzellen : 527 cpm
Als positiv gelten Ergebnisse mit Faktor $>$ 2
cpm = counts per minute

Tab. 10 Übersichtliche Darstellung der Klone, deren Antikörper mit Rattengliomzellen reagieren, jedoch mit verschiedenen normalen Rattenzellen keine Bindungen eingehen (RIA)

normale Ratten-hirnzellen	13GC1$^+$ TC2	14AC1$^+$ BC1$^+$ FC3$^+$	14GC1$^+$ KC1$^+$ LC1$^+$	14WC1 XC2 ZC1$^+$	11/18
normale Ratten-nierenzellen	13GC1$^+$ LC3 TC2 WC1	14AC1$^+$ BC1$^+$ FC3$^+$	14GC1$^+$ KC1$^+$ LC1	14XC2 ZC1$^+$	12/18
normale Ratten-hirn- und -nierenzellen	13GC1$^+$ TC2	14AC1$^+$ BC1$^+$ FC3$^+$	14KC1$^+$ LC1$^+$	14XC2 ZC1$^+$	9/18

$^+$ Klone, deren Ergebnisse im RIA mit denen der IPF übereinstimmen

3.2. Kreuzreaktion selektierter monoklonaler Antikörper mit anderen chemisch induzierten Rattengliomen

Für die Kreuzreaktionstests wurden außer der zur Immunisierung von Balb/c Mäusen verwendeten Gliomlinie 79FR-G-41 vier weitere Gliomlinien untersucht, deren Stammtumoren auf die gleiche Art chemisch induziert worden waren. Die Untersuchungen wurden mit zwei verschiedenen Verfahren durchgeführt.
Mit Hilfe der indirekten Immunperoxidasefärbung (IPF) konnten außer bei zwei Klonen (14KC1, 14LC1) deutliche Kreuzreaktionen bei allen anderen festgestellt werden. Das Spektrum der Erkennbarkeit anderer Gliomlinien variierte von Klon zu Klon. Neben dem Nichterkennen einer oder mehrerer Gliomlinien gab es die verschiedensten Reaktionsmuster, die von schwachen bis starken Reaktionen reichten (Abb. 4). Die Auswertung des Radioimmunoassays erfolgte nach den Prinzipien wie in 3.1.2. dargelegt. Alle getesteten Klone sind in Tabelle 11 aufgeführt, während Tabelle 12 in gewichteter Form die Ergebnisse der Klone zusammenfaßt, deren Kulturüberstände mit Hirn- und Nierenzellen nicht reagierten, dagegen aber mit unterschiedlichem Erkennungsmuster Kreuzreaktionen mit anderen chemisch induzierten Gliomen aufwiesen. Die Ergebnisse fielen ähnlich wie die der IP-Färbung aus.

Tab. 11 Kreuzreaktionen monoklonaler 79FR-G-41-Antikörper mit weiteren Zellinien chemisch induzierter Rattengliome (RIA)

Klon	79FR-G-41	78FR-G-284	78FR-G-344	78FR-G-299	78FR-G-219
X63-Ag8.653	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
13BC1	1,1	3,7	0,9	4,4	1,5
DC1	0,6	1,6	0,8	1,2	1,6
EC3	1,9	4,6	4,0	9,3	1,3
FC1	0,8	2,6	1,7	4,5	2,9
GC1	6,9	6,5	3,2	8,2	6,1
KC1	1,8	6,7	4,1	6,7	8,5
LC3	1,9	6,7	1,2	1,7	4,8
TC2	11,0	10,2	4,0	3,1	7,5
OC1	1,1	11,5	1,4	2,5	6,5
VC3	1,6	10,9	0,4	1,2	2,9
WC1	2,5	6,6	0,6	0,9	3,2
XC1	2,2	8,0	3,7	0,6	9,8
YC1	2,1	5,3	3,0	1,5	5,4
14AC1	16,0	12,0	4,1	8,2	8,7
BC1	11,3	10,5	4,0	9,9	6,9
DC1	2,2	9,2	3,4	9,6	5,8
FC3	8,5	4,3	1,5	1,9	3,3
GC1	12,1	2,4	1,3	3,2	4,0
HC1	1,8	2,5	1,1	2,1	3,0
IC3	1,9	4,2	2,2	2,0	4,3
KC1	6,5	1,7	0,6	1,1	2,4
LC1	9,5	2,0	0,7	1,5	2,4
PC2	1,2	6,2	0,9	2,6	2,1
VC1	2,0	4,3	2,0	1,6	2,8
WC1	1,0	3,8	1,2	2,9	1,8
WC2	1,6	6,3	2,0	2,6	
XC2	2,9	2,3	1,3	1,6	2,3
ZC1	9,0	7,6	2,0	3,9	0,9

Die Ergebnisse sind dargestellt als Faktor cpm/cpm$_{X63\text{-}Ag8.653}$

Der Myelomzellüberstand von X63-Ag8.653 ergab mit den Zielzellinien 79FR-G-41 : 540 cpm

" 78FR-G-284 : 678 cpm

" 78FR-G-344 : 1011 cpm

" 78FR-G-299 : 889 cpm

" 78FR-G-219 : 796 cpm

Als stark positiv gelten die Ergebnisse mit Faktor > 7

positiv $3 < F \leq 7$

schwach positiv $1{,}5 < F \leq 3$

negativ $F \leq 1{,}5$

Tab. 12 Kreuzreaktionen monoklonaler 79FR-G-41-Antikörper mit Zellinien vier verschiedener chemisch induzierter Rattengliome (RIA/IPF)

	Gliomlinien				
Klone	79FR-G-41	78FR-G-284	78FR-G-344	78FR-G-299	78FR-G-219
13GC1	++	+	+	++	+
14AC1	++	++	+	++	++
14BC1	++	++	+	++	+
14FC3	++	+	-	(+)	+
14KC1	+	(+)	-	-	(+)
14LC1	++	(+)	-	-	(+)
14ZC1	++	++	(+)	+	-

++	stark positiv	:	Faktor $\frac{cpm}{cpm_{x63}} > 7$
+	positiv	:	$3 < F \leq 7$
(+)	schwach positiv	:	$1,5 < F \leq 3$
-	negativ	:	$F \leq 1,5$

3.3. Stabilität der Gliomantigene

Die indirekte Immunofluoreszenzmethode wurde angewendet, um die Stabilität der Gliomantigene nach der Behandlung mit verschiedenen Fixierungsmitteln zu überprüfen. Präparate der zur Immunisierung verwendeten Gliomlinie 79FR-G-41 wurden mit Aceton, Glutaraldehyd und Formalin behandelt und daraufhin mit 3 ausgewählten Klonprodukten (13GC1, 14BC1 und 14FC3), die normale Rattenzellen nicht erkennen, beschichtet. Die durch diese Klonprodukte erkannten Antigene waren gegen jedes der drei Fixationsmittel stabil (Tab. 13). Eine von Präparation zu Präparation unterschiedliche Zellzahl (20 - 95%) zeigte eine spezifische Membranfluoreszenz. Die fluoreszierenden Strukturen finden sich in unterschiedlicher Verteilung als diffuse punktförmige oder flächenförmige Ansammlungen körnigen Materials an der Membran des Zellkörpers und der Fortsätze. Ihre Stabilität gegen ein Methanol/Acetongemisch 1:1 hatte sich bereits in den IP-Färbungen gezeigt.

3.4. Bestimmung der Immunglobulinklasse

3.4.1. Immunodiffusion

Zehnfach konzentrierte Kulturüberstände von drei ausgewählten Klonen (13GC1, 14BC1, 14FC3) wurden im Agargel-Immundiffusionstest gegen Kaninchen-anti-Maus-IgG bzw. -IgM getestet. Bei allen drei Proben sprachen die beobachteten Präzipitationslinien für die Anwesenheit von IgG im Kulturüberstand (Tab. 13; Abb. 4).

Tab. 13 Zusammenfassung einiger Eigenschaften monoklonaler Antikörper, die selektiv mit Rattengliomzellen reagieren.

KLON	Stabilität der Antikörperproduktion (3.Klonierungsstufe)	Antikörper	Zielzelle			Stabilität der Gliomantigene		
			79FR-G-41	Glia-Zelle	Nierenzelle	Aceton	Glutaraldehyd	Formalin
13GC1	100%	IgG	+	-	-	+	+	+
14BC1	94%	IgG	+	-	-	+	+	+
14FC3	95%	IgG	+	-	-	+	+	+

3.4.2. Immunelektrophorese

Die immunelektropheretische Untersuchung der Produkte von den Klonen 13GC1 und 14BC1 erbrachte Präzipitationslinien, die auf die Anwesenheit von IgG schließen lassen.

3.5. Absorptionsversuche

Absorptionsversuche wurden mit zwei Gliomzellinien, der zur Immunisierung verwendeten Linie 79FR-G-41 und mit der kreuzreagierenden Linie 78FR-G-344 durchgeführt. Kulturüberstände selektierter Klone (13GC1, 14BC1, 14FC3), die nicht mit normalen Rattenzellen reagierten, wurden mit steigenden Gliomzellzahlen inkubiert. Nach Abschluß des Absorptionsverfahrens wurden die zellfrei zentrifugierten Proben in drei verschiedenen Methoden (IPF, RIA, micro-ELISA) gegen 79FR-G-41 Zellen als "target"-Zelle getestet.

Mit Hilfe der IP-Färbung wurde eine Absorptionskinetik erstellt, um Anhaltspunkte zu erhalten, ab welchem Verhältnis von µl Kulturüberstand/Zellzahl eine Verringerung der Antikörperkonzentration zu erwarten wäre. Die Auswertung des Testes erfolgte unter dem Lichtmikroskop, wobei eine Einteilung in vier Intensitätsstufen vorgenommen wurde. Es zeigte sich, daß mit steigenden, zur Absorption verwendeten Zellzahlen, die Färbung der Targetzellen 79FR-G-41 schwächer wurde. Bei allen drei Versuchsansätzen (13GC1, 14BC1, 14FC3) war die Menge der noch in den Proben verbleibenden Antikörper, bei einer Inkubation von 100 µl Kulturüberstand mit 10^7 Gliomzellen, unter die Nachweisgrenze gesunken (Abb. 5).

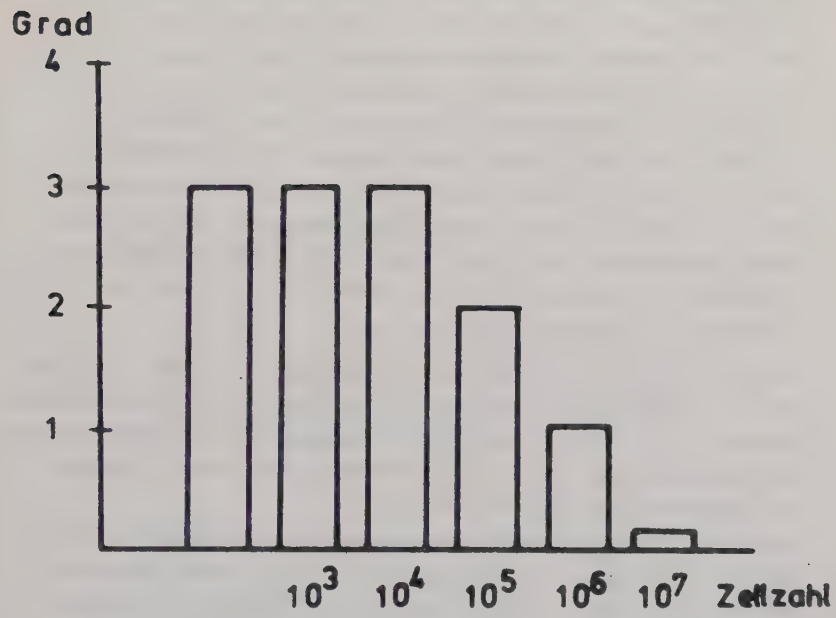

Abb. 5: Absorption von Kulturüberstand des 79FR-G-41-Antikörper produzierenden Klones 14FC3 mit Gliomzellen der Linie 79FR-G-41 (IPF).

Die Ergebnisse des Radioimmunoassays können der Abbildung 6 entnommen werden. Es wurden Kulturüberstände der gleichen Klone wie oben verwendet und mit Zellen der Linie 79FR-G-41 und der kreuzreagierenden Linie 78FR-G-344 absorbiert. Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurden die Resultate folgendermaßen dargestellt: Den "counts per minute" (cpm) der nicht absorbierten Kulturüberstände wird der Wert 100 zugeordnet. Die cpm der absorbierten Proben werden als Teil von 100% angegeben. Die Minimumlinie entspricht dem Prozentsatz des doppelten Wertes der negativen Kontrolle. Über ihr sind die Werte als positiv, darunter als negativ zu bewerten.

Einige Kurven weisen im oberen Bereich, also bei niedrigeren zur Absorption verwendeten Zellzahlen eine ansteigende Prozone auf. Auffallend ist das Absinken aller Kurven unter die Minimumlinie bei einer Inkubation von 100 µl Kulturüberstand mit 10^7 Gliomzellen.
Auch bei der photometrischen Auswertung eines weiteren Versuchsansatzes im micro-ELISA sank die Antikörperkonzentration unter die Nachweisgrenze, wenn 100 µl Kulturüberstand mit 10^7 79FR-G-41 Zellen bzw. 10^7 78FR-G-344 Zellen versetzt wurden (Abb. 7).

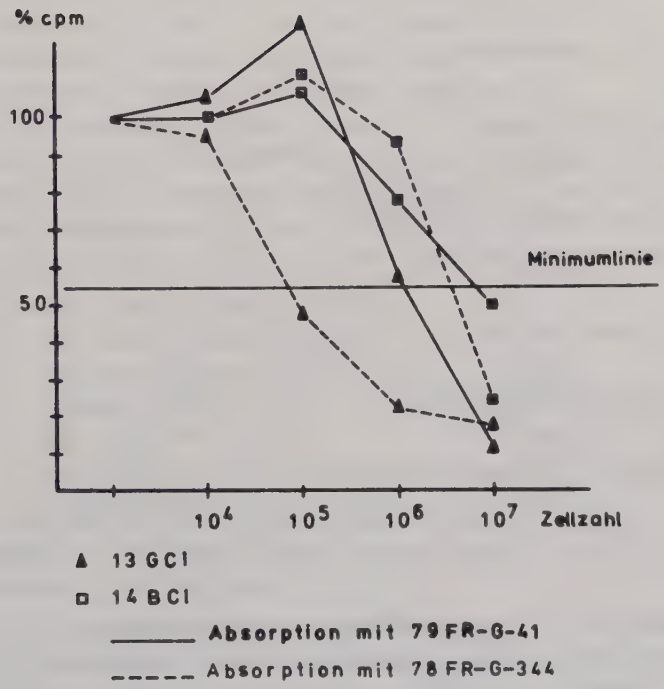

Abb. 6: Absorption von Kulturüberständen 79FR-G-41-Antikörper produzierender Klone mit Zellen chemisch induzierter Rattengliome (RIA).

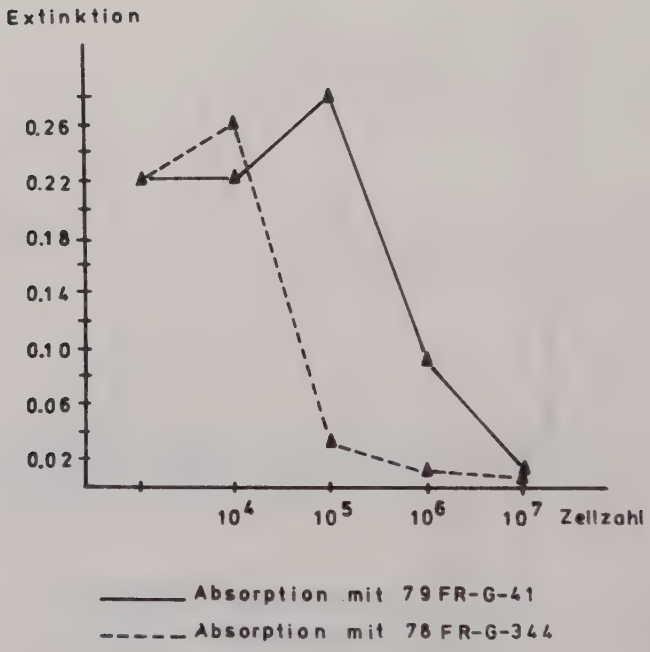

Abb. 7: Absorption von Kulturüberständen des 79FR-G-41-Antikörper produzierenden Klones 13GC1 mit Zellen chemisch induzierter Rattengliome (micro-ELISA).

4. Intraperitoneale Transplantation von Hybridomen und Ascitesgewinnung

Für immunbiologische Untersuchungen sind höhere Antikörperkonzentrationen nötig, als sie im Überstand von Zellkulturen zu erreichen sind. Aus diesem Grunde wurde von der Möglichkeit, Hybridome in vivo zu transplantieren, Gebrauch gemacht. Lebende Zellen gut wachsender Klone wurden in die Bauchhöhle von Balb/c Mäusen verpflanzt.
Aus der Literatur ist bekannt, daß die Transplantation der Hybridome, trotz Histokompatibilität von Empfänger und Zellen, nicht ohne weiteres gelingt. Hinweise, ob und wie die Empfänger vorbehandelt werden können, variieren erheblich, so daß die Versuche in vier Gruppen durchgeführt wurden.

Gruppe A: unbehandelte Kontrolltiere
B: mit Dexametason 0,1 mg s.c. systemisch immunsuppressiv behandelte Tiere
C: Makrophagenstimulation mit Thioglycollat-Medium 0,5 ml/Tier i.p.
D: mit 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan (= Prestane^{R}) i.p. behandelte Tiere.

Gruppe D wurde nochmals unterteilt in kurzzeit- und langzeitvorbehandelte Empfänger (Tab. 14).

Transplantationserfolge waren ausschließlich in der Gruppe D zu erzielen, wenn die Tiere mindestens 3 Wochen zuvor mit Prestane^{R} vorbehandelt worden waren (Abb. 4). Es entwickelte sich in diesen Fällen eine sterile Peritonitis, die die Implantation der Zellen erleichterte. Nach ca. einer Woche konnten im allgemeinen 4 ml zellfreie Flüssigkeit gewonnen werden. Die Hybridome hatten sich währenddessen in der Bauchhöhle massiv vermehrt. Das Punktat enthielt durchschnittlich 10^{8} Zellen/ml. Es stellte sich, entgegen anderen Hinweisen heraus, daß den Tieren, bis auf

eine Ausnahme, nur einmal Ascites abgenommen werden konnte. Sie erholten sich im allgemeinen nach der Punktion und blieben "trocken".
Alle Tiere, die 4 Wochen nach der i.p. Transplantation keinen Ascites entwickelt hatten, wurden getötet und nach der Spülung der Bauchhöhle mit sterilem PBS-A seziert. Es konnten bei diesen Tieren weder anzüchtbare Hybridomzellen isoliert werden, noch zeigten sich solide Tumoren.
Durch Verdünnungsreihen wurde für Ascitesproben der Klone 13GC1, 14BC1 und 14FC3 in der IP-Färbung ein Titer von 1:100 000 festgestellt.

Tab. 14 Ascitesgewinnung nach intraperitonealer Transplantation antikörperproduzierender Hybridome bei unterschiedlicher Vorbehandlung der Empfänger

Gruppe	Vorbehandlung	Zeitraum bis zur Transplantation	Zellzahl $x10^6$	Klon	Zahl der Mäuse	Ascites ausgebildet nach	Flüssigkeitsmenge
A	-	-	1	14OC2	4	-	-
	-	-	2	13VC3	4	-	-
	-	-	10	14OC2	4	-	-
B	Dexametason 0.1 mg s.c.	24 Stunden	15	14OC2	10	-	-
C	Thioglycollatmedium 0,5 ml i.p.	10 Tage	10	14FC3	5	-	-
		"	10	13GC1	5	-	-
D	Tetramethylpentadecan 0,5 ml i.p.	5 Tage	1	14OC2	1	-	-
		6 "	2	13VC3	1	-	-
		6 "	2	13OC1	1	-	-
		8 "	1	14EC1	1	-	-
		8 "	1	14VC3	1	-	-
		8 "	2	14BC1	1	-	-
		8 "	2	13JC2	1	-	-
		8 "	2	13CC2	1	-	-
		3 Wochen	3	14XC1	2	12 Tagen	je 4 ml
		"	10	14FC3	2	"	"
		"	10	13GC1	2	8 "	3 ml
							4 ml
		"	10	14BC1	2	-	-
		"	10	14BC1	1	8 Tagen	4 ml
		4 "	10	14BC1	1	"	"
		8 "	10	14OC2	4	-	-
		8 "	10	14OC2	2	8 Tagen	je 4 ml
		9 "	2	14OC2	1	"	2 ml

D. DISKUSSION

Aus den beiden in dieser Arbeit beschriebenen Fusionen zwischen Milzzellen von Mäusen, die mit Rattengliomzellen der Zellinie 79FR-G-41 immunisiert worden waren und der Myelomlinie X63-Ag8.653 gingen 73 Hybridomkolonien hervor, die Antikörper gegen das Immunogen produzierten. Dies bedeutet eine Rate von 44% positiven Kolonien. Bei anderen Autoren variieren die Angaben über Ausbeuten an antikörperproduzierenden Hybridomen erheblich. Schnegg et al. (1981) grundimmunisierten Mäuse mit 10^7 Gliomzellen des Menschen i.p., boosterten mit der gleichen Dosis 4 Wochen später i.p. und erhielten 10% Hybridome, welche Antikörper sezernierten. Koprowski et al. (1978a) immunisierten Mäuse mit 3×10^7 Melanomzellen des Menschen i.p., boosterten 4 Wochen später mit 10^6 Zellen; 31% ihrer Hybridome sezernierten Antikörper. Mit viralem Antigen erhielten Koprowski et al. (1978b) sogar bei 75% aller getesteten Kulturen solche, die Antikörper sezernierten. Kennett et al. (1979) erhielten 44% positive Kolonien, die Antikörper gegen eine Neuroblastomlinie des Menschen bildeten. Im Vergleich hierzu erscheint die Ausbeute der in dieser Arbeit dargestellten Versuche zufriedenstellend.

Es zeigte sich, daß neben der Fusionstechnik auch die Immunisierung der Tiere, also Zellzahl und Applikationsweise der Zellen, von Bedeutung für die Ausbeute war. Sowohl bei der Grundimmunisierung als auch bei der Boosterung wurde die Verabreichung kleiner Antigendosen bevorzugt, um eine immunologische Paralyse zu vermeiden.

Die intraperitoneale Applikation des Antigens erschien aus theoretischen Erwägungen günstiger als die intra-

venöse, da es bei letzterer zu einer unmittelbaren Neutralisation des Antigens kommen kann und somit nur ungenügend Milzzellen stimuliert werden könnten (Buchmaier, 1980). Es war wichtig, die grundimmunisierten Tiere einige Monate ruhen zu lassen, damit bei der wiederholten Antigengabe möglichst wenig präformierte humorale Antikörper vorhanden waren, die die Ausbildung der neuen Immunreaktion gehemmt hätten. Die Immunisierung hatte nicht zum Ziel hohe Antikörpertiter im Blut des Milzspenders zu erzielen, sondern möglichst viele "memory"-Lymphozyten, die bevorzugt in der Milz lokalisiert sind, zu stimulieren.
Bei den vorliegenden Fusionen hat sich der ph-Wert des Mediums von 8,3 bewährt, ebenso die Abwesenheit von Ca^{++}-Ionen, welche durch den Zusatz von Na-EDTA (Schneidermann et al., 1979) erreicht wurde. Das pH-Optimum für Zellfusionen wurde bereits von Croce et al. (1972) im alkalischen Bereich ermittelt.
Aus den Erfahrungen bei weniger erfolgreichen Fusionen hat sich des weiteren gezeigt, daß die Zellen möglichst wenig mechanisch beansprucht werden sollten und Zellklumpen nicht zerstört werden dürfen. Die Agglutination von Zellen ist ein deutlicher Hinweis, daß die erste Phase der Zellfusion (Knutton et al., 1979) erfolgreich abläuft. Auch die Zentrifugation nach der Einwirkung des Polyäthylenglykollmediums soll schonend, mit niedriger Beschleunigung und dafür länger erfolgen.
Als "feeder-layer" unmittelbar im Anschluß an die Fusion schienen sich native Milzzellen von Balb/c Mäusen für dieses System günstig auszuwirken, während Mäuseperitonealzellen für alle weiteren Kultivationsstufen von Vorteil waren. Mit Hilfe der Peritonealzell-"feeder-layers" konnten einzelne Hybridomkulturen hoch verdünnt bis zu einer Zelle/Vertiefung in kleinen Volumina (0,2 - 2,0 ml) gezüchtet werden.

Von mehreren Autoren wurde auf die Instabilität der Hybridzellen hingewiesen (Köhler et al., 1976; Hengartner et al., 1978; Galfré et al., 1980). Diese beruht im Allgemeinen auf Chromosomenverlusten, da der Verlust der Antikörperproduktion irreversibel ist. Um die Stabilität der Klone einschätzen zu können und nur die besten zu kultivieren, wurde nach jeder Klonierungsstufe die Ausbeute positiver Klone festgestellt. Einige Klone brachten in der 3. Klonierungsstufe unverhältnismäßig schlechte Resultate, welches mit der Umstellung der Zellen von HAT- auf Normalmedium zu jener Zeit in Zusammenhang gebracht werden kann (Tab. 4). Jene Klone zeigten bei der nächsten Klonierung wieder bessere Ergebnisse. Obwohl bei der Selektion auf hohe Klonierungsausbeuten geachtet wurde, stellte einer der drei über lange Zeit kultivierten Klone (14FC3), bei guter Lebensfähigkeit der Zellen, seine Antikörperproduktion nach 7 Monaten ein. Diese Zellen wurden verworfen und auf frühzeitig eingefrorene Zellchargen zurückgegriffen, um die Experimente mit den Antikörpern des gleichen Klones weiterführen zu können.

Die Immunglobuline der drei Klone 13GC1, 14BC1 und 14FC3 ließen sich der IgG-Klasse zuordnen. Es ist zu erwarten, daß auch die anderen Klonprodukte zum größten Teil dieser Klasse angehören werden, da der Immunisierungsplan mit Erst- und Boosterinjektionen auf die Stimulation eines hohen Anteils später IgG produzierender Blastzellen ausgerichtet war. Darüberhinaus haben Gerhard et al. (1980) gezeigt, daß bei einer Fusion von Myelomzellen mit Milzlymphozyten (im Gegensatz zu Fusionen mit Lymphknotenlymphozyten) 73% IgG produzierende, 27% IgM produzierende und keine IgA produzierende Hybridzellen entstanden waren.

Die Ascitesflüssigkeit der in vivo-Transplantate zeigten

in der IP-Färbung gegen Rattengliomzellen Titer bis 1:100 000. Diese sind sicher nicht nur auf die hohe Konzentration monoklonaler Antikörper zurückzuführen, sondern auch auf möglicherweise in der Maus vorkommende anti-Ratten-Immunglobuline, die dieser biologischen Flüssigkeit beigemischt sind.

Unter den 109 Klonen, deren Antikörper gegen die verschiedensten von Gliomzellen exprimierten Antigene gerichtet waren, konnten 9 selektiert werden, die spezifische Bindungen mit der Gliomzellinie 79FR-G-41 eingingen. Diese zeigten keine Reaktionen mit normalen Zellen der Ratte, welche mit den verwendeten Techniken hätten nachgewiesen werden können (Tab. 10). Hierbei handelt es sich wohl um Antigene, die vorwiegend an der Oberfläche der zur Immunisierung der Milzspender herangezogenen Gliomlinie vorkommen. Sechs dieser neun Klone gehören jener Gruppe an, deren Antikörper mit der Gliomzelloberfläche nur flächenförmig begrenzt Reaktionen eingehen (Tab. 6; Abb. 4). Sie stehen im Gegensatz zu jenen Klonen, deren Antikörper in der Lage sind, die gesamte Zellmembran homogen gefärbt erscheinen zu lassen. Innerhalb desselben Präparates traten beide Reaktionsformen nicht gemischt auf, so daß es sich um verschiedene Verteilungsmuster von Antigenen handelt, die durch verschiedene monoklonale Antikörper erkannt werden.

Bei der Testung der monoklonalen Antikörper in der indirekten Immunperoxidasefärbung erschienen bei vielen positiven Einzelproben einige wenige Zellen ungefärbt. Es wurde noch nicht geklärt, ob es sich hierbei um eine genetisch bedingte Heterogenität der Zellpopulation oder um eine zellzyklusbedingte Variabilität in der Expression von Antigenen handelt.

Bei der Prüfung sieben verschiedener spezifischer 79FR-G-41-Antikörper auf Kreuzreaktionen mit vier

weiteren chemisch induzierten Rattengliomen konnten unterschiedliche Erkennungsmuster festgestellt werden (Tab. 12; Abb. 4). Das Spektrum reichte von Kreuzreaktionen mit allen anderen über schwächere Reaktionen mit einigen bis zum Nichterkennen mehrerer Linien. Die Antikörper der Klone 14KC1 und 14LC1 zeigten mit 2 Gliomlinien keine Reaktion und mit zwei weiteren eine nur sehr geringe, während sie deutlich positive Ergebnisse mit der zur Immunisierung verwendeten Gliomlinie erbrachten. Die Produkte aller anderen getesteten Klone wiesen ein unterschiedliches Kreuzreaktionsmuster mit den verschiedenen Gliomlinien auf.

Aus diesem Bindungsverhalten geht hervor, daß die chemisch induzierten Rattengliome gemeinsame antigene Determinanten besitzen. Auch liegt der Schluß nahe, daß es mehrere solcher Antigene geben dürfte. Untersuchungen, welche klären sollen, ob ein monoklonaler Antikörper an zwei verschiedenen Gliomlinien zwei verschiedene oder identische gliomassoziierte Antigene erkennt, stehen jedoch noch aus.

Die Absorptionsversuche von Kulturüberständen mit 79FR-G-41 und mit der kreuzreagierenden Linie 78FR-G-344 sollten indirekt die Bindungsfähigkeit der Antikörper an die Gliomzelle nachweisen. Beide Gliomlinien, sowohl die eigentliche als Antigen verwendete Linie, als auch die kreuzreagierende 78FR-G-344, waren in der Lage, die Antikörper aus dem Kulturüberstand zu binden und ihre Konzentration nachweisbar zu verringern. Auffallend war bei jedem Versuch das Absinken der Antikörperreaktivität unter die Minimumlinie bei einer Inkubation von 10^7 Gliomzellen mit 100 µl Kulturüberstand. Vergleichbare Relationen von Gliomzellen und Hybridomkulturüberstand benötigten auch Wikstrand et al. (1982), um eine Verringerung der Antikörperaktivitäten zu erreichen.

Die Absorptionskurven (Abb. 2 und 3) zeigen in 5 Fällen eine Prozone, in der mit steigender, zur Absorption verwendeten Zellzahl, also mit sinkender Antikörperkonzentration, die Kurve ansteigt. Dieser Effekt kann in den Absorptions- und Verdünnungskurven mehrer Autoren beobachtet werden (Galfré et al., 1977; Trowbridge et al., 1978; Koprowski et al., 1978a; Herlyn et al., 1979b) und wird von Bechtol et al. (1980) ausdrücklich erwähnt. Es handelt sich hierbei um das Phänomen, daß es im Bereich äquivalenter Proportionen von Antigen und Antikörper zu einer optimalen Verbindung der beiden kommt und weder vom einen noch vom anderen ein Überschuß bleibt (Roitt, 1977). Wenn während der Absorption bei konstanter Antikörperkonzentration mit steigender Antigenmenge (= Zellzahl) eine Bindung stattgefunden hat, so sollten im zellfreien Überstand nach der Absorption immer weniger Antikörper zu finden sein. Bei Antigenüberschuß, hier einem Einsatz von 10^7 Zellen/100 µl Kulturüberstand, wurden nahezu alle Antikörper von den Zellen gebunden und abzentrifugiert. Im anschließenden Nachweisverfahren auf restliche Antikörper, in dem die Antigenmenge konstant gehalten wurde, nahm die Antikörperkonzentration, entsprechend der steigenden zur Absorption verwendeten Zellzahl, ab. Die Prozone der Absorptionskurven (Abb. 2 und 3) bringt zum Ausdruck, daß ein optimales Antigen-Antikörperverhältnis erst bei einer Verdünnung des originalen Kulturüberstandes erreicht wird.
Aufgrund der vorliegenden Befunde bleibt weiterhin ungeklärt, inwieweit es sich bei den nachgewiesenen gliomassoziierten Antigenen um Neoantigene (Sikora et al., 1982), um Differenzierungsantigene (Wikstrand et al., 1982) oder um solche Antigene handelt, die allen Geweben gemeinsamen embryologischen Ursprungs eigen sind (Schnegg et al., 1981a). Mit Hilfe spezifischer monoklonaler Hybridomantikörper wird dies künftig untersucht werden kön-

nen. Man wird feststellen können, ob kreuzreagierende Antigene verschiedener Gliomlinien die gleiche Struktur aufweisen, wird sie in gereinigter Form gewinnen und ihre biochemische Natur klären können.
Die Anwendung gliomspezifischer Antikörper in vivo eröffnet neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten. Ein therapeutischer Nutzen könnte durch ihr Mitwirken bei der komplementvermittelten oder antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität erzielt werden. Sie könnte mögliche zirkulierende Tumorantigene neutralisieren, welche über die Aktivierung von "suppressor"-T-Zellen eine wirkungsvolle Immunabwehr des Gliomträgers verhindern. Darüberhinaus ist es möglich, daß sie als spezifische "carrier" von Radioisotopen, Toxinen oder bestimmten Pharmaka benutzt werden könnten, um jene gezielt an ihren gewünschten Wirkungsort zu bringen.
Der Wert einer Antikörpertherapie wird jedoch weitgehend davon abhängen, inwieweit Zellen in Gliomen vorhanden sind, welche ein bestimmtes tumorassoziiertes Antigen nicht oder nur zeitweise exprimieren. Diesem Phänomen kann wahrscheinlich durch die Kombination sich ergänzender monoklonaler Antikörper begegnet werden, die jeweils verschiedene Antigene erkennen. Auf diese Weise könnte man dem eigentlichen Zweck der Tumortherapie, alle Gliomzellen zu einem bestimmten Zeitpunkt gezielt zu zerstören, näher kommen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Antikörper produzierende Hybridzellen wurden durch Fusion von Mausmyelomzellen der Linie X63-Ag8.653 und Maussplenocyten hergestellt. Die Milzspender waren zuvor mit der Gliomlinie 79FR-G-41 immunisiert worden, einer Zellinie, die von einem chemisch induzierten Rattengliom stammt. Die Fusion wurde unter Verwendung einer 50%igen Polyäthylenglykol-Lösung durchgeführt. Die in vitro Etablierung von permanenten Hybridzellkulturen wurde mit Hilfe von Mäuseperitonealzellen erreicht.

Unter 165 Plattenvertiefungen, die ein Hybridomwachstum aufwiesen, konnten in 78 Hybridome gefunden werden, die Antikörper gegen das Immunogen produzierten.

Aus diesen Hybridomen wurden Klone nach der Endpunktverdünnungsmethode isoliert. Ihre Antikörper wurden auf ihr Vermögen, spezifische Bindungen mit Rattengliomzellen einzugehen, getestet. Die Antikörper von 11 Klonen erkannten keine normalen Rattenhirnzellen, von 12 Klonen keine normalen Rattennierenzellen. Daraus resultierten 9 Klone, deren Antikörper weder mit den einen noch mit den anderen reagierten, jedoch eine starke Bindungsaffinität zu der Gliomlinie 79FR-G-41 zeigten. Sie konnten der Immunglobulinklasse G zugeordnet werden.

Kreuzreaktionen der selektierten monoklonalen 79FR-G-41-Antikörper konnten mit 4 weiteren chemisch induzierten Rattengliomlinien nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Antikörper verschiedener Klone unterschiedliche Erkennungsmuster.

Durch Absorption von Kulturüberständen der Klone 13GC1, 14BC1 und 14FC3 mit Gliomzellen der zur Immunisierung verwendeten Linie, konnte die Antikörperaktivität bei 10^7 Zellen/100 µl unter die Nachweisgrenze gesenkt werden.

Ausgewählte Hybridome wurden in die Bauchhöhle von Mäusen, die mit Prestane^{R} vorbehandelt waren, transplantiert. Die nach einer Woche gewonnene Ascitesflüssigkeit enthielt im Vergleich zu den Kulturüberständen wesentlich höhere Konzentrationen monoklonaler Antikörper.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung durch die W. Sander-Stiftung (Sta-81.007.01) durchgeführt.

SUMMARY

Hybrid cells which produce antibodies, were made by fusing mouse myeloma cells of the cell line X63-Ag8.653 with mouse splenocytes. Spleens were taken from mice primed with glioma cells of the line 79FR-G-41, established from a chemically induced rat glioma. The fusion was promoted by a 50% polyethyleneglycol solution. Mouse peritoneal cells enabled the in vitro establishment of permanent hybridoma cell cultures.

In 78 wells out of 165 which showed hybridoma growth, cells were found to produce antibodies against the immunogen. From these hybridomas clones were isolated by limiting dilution procedures.

Antibodies of 18 clones were tested for their ability to bind specifically to rat glioma cells. Antibodies of 11 clones didn't recognize normal rat kidney cells. Nine clones resulted, whose antibodies reacted neither with the former nor with the latter, but showed a strong binding affinity to the glioma cell line 79FR-G-41. They were shown to be IgG.

Crossreactions of selected monoclonal 79FR-G-41 antibodies were demonstrated with four additional chemically induced rat gliomas. The antibodies of these clones showed different recognition patterns.

In absorption experiments the antibody activity of culture supernatants (13GC1, 14BC1, 14FC3) could be decreased below the detection limit by incubating 10^7 glioma cells with 100 µl of supernatant.

Selected hybridomas were transplanted into the abdomenal cavity of mice, pretreated with Prestane^R. Ascite fluid samples taken one week later contained considerably higher concentrations of monoclonal antibodies than the corresponding culture supernatant.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Albright, L., Madigan, J.C., Gaston, M.R., Houchens, D.P.: Therapy in an intracerebral murine glioma model, using Bacillus Calmette-guérin, neuraminidase treated tumor cells and 1-(2-chloroethyl)-3-cyclo-hexyl-nitrosourea. Cancer Res. 35, 658-664 (1975)

Ashwood Smith, M.J.: Preservation of mouse bone marrow at 79°C with dimethylsulfoxide.
Nature 190, 1204-1205 (1961)

Baldwin, R.W.: Immunological aspects of chemical carcinogenesis.
Advanc. Cancer Res. 18, 1-75 (1973)

Barski, G., Sorieul, S., Cornefert, F.: "Hybrid" type cells in combined cultures of two different mammalian cell strains.
J. Nat. Cancer Inst. 26, 1269-1291 (1961)

Bechtol, K.B.: Radioimmunoassay.
In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.) Monoclonal Antibodies, Plenum Press 1980a

Bechtol, K.B.: Quantitativ absorption/blocking assay.
In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.) Monoclonal Antibodies. Plenum Press 1980b

Bechtol, K.B., Jonak, Z.L., Kennett, R.H.: Germ cell related and nervous system related differentiation- and tumor-antigens.
In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.) Monoclonal Antibodies. Plenum Press 1980

Bernstein, J.D., Nowinski, R.C., Tam, M.R., McMaster, B., Huston, L.L., Clark, E.A.: Monoclonal antibody therapy of mouse leukemia.
In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.) Monoclonal Antibodies, Plenum Press 1980

Bigner, D.D., Bigner, S.H., Ponten, J., Westermark, B., Mahaley, M.S., Ruostathi, E., Herschman, H., Eng, L.F., Wikstrand, C.F.: Heterogenicity of genotypic and phenotypic characteristics of 15 permanent cell lines derived from human gliomas.
J. Neuropath. Exp. Neurol. 40, 201-229 (1981)

Bilzer, Th., Stavrou, D.: Comparison of cell mediated reactivity against nativ and chemically modified rat glioma cells.
J. Canc. Res. Clin. Oncol. 99, A 65 (1981)

Buchmaier, M.J., Lewicky, H.A., Tomori, O., Johnson, K.M.: Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis virus react with pathogenic arena viruses.
Nature 288, 486-487 (1980)

Buddecke, E.: Grundriß der Biochemie
Walter de Gryter, Berlin-New York 1974

Burnet, F.M.: The clonal selection therapy of aquired immunity.
Cambridge University Press, Cambridge England

Carrel, S., de Tribolet, N., Mach, I.P.: Expression of neuroectodermal antigens common to melanomas and gliomas and neuroblastomas.
Acta Neuropath. 57, in press (1982)

Coakham, H.B.: Surface antigen(s) common to human astrocytoma cells.
Nature (Lond.) 250, 328-330 (1974)

Coakham, H.B., Kornblith, P.L., Quindlen, E.A., Pollok, L.A., Wood, W.C., Harnett, L.C.: Autologous humoral response to human gliomas and analysis of certain cell surface antigens: in vitro study with the use of microcytotoxicity and immune adherence assays.
J. Nat. Canc. Inst. 64, 223-233 (1980)

Coffino, P., Baumal, R., Laskov, R., Scharff, M.D.:
Cloning of mouse myeloma cells and detection of rare variants.
J. Cell. Physiol. 79, 429-440 (1972)

Cohn, M.: Natural history of the myeloma.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32, 211 (1967)

Coons, A.H.: The application of fluorescent antibodies to the study of naturally occuring antibodies.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 69, 658-662 (1957)

Cornain, S., Carnaud, C., Silverman, D., Klein, E., Rajewsky, M.F.: Spleen cell reactivity against transplanted neurogenic rat tumors induced by ethylnitrosourea: uncovering of tumor specifity after removal of complement receptor bearing lymphocytes.
Int. J. Cancer 16, 301-311 (1975)

Cravioto, H.: Immunology of experimental brain tumors.
In: H. Waters (ed.) The handbook of cancer immunology, Vol. 3, 329-363. New York-London: Garland STPM Press (1978)

Croce, C.M., Koprowski, H., Eagle, H.: Effect of environmental pH on the efficiency of cellular hybridisation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1953-1956 (1972)

Davidson, R.L., Gerald, P.S.: Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridisation by polyethylene glycol.
Somatic Cell Genetics 2, 165-176 (1976)

Douillard, J.Y., Hoffmann, T., Herberman, R.B.: Enzyme-linked immunosorbent assay for screening monoclonal antibody production: Use of intact cells as antigen.
J. Immunol. Meth. 39, 309-316 (1980)

Druckrey, H., Ivanković, S., Preussmann, R.: Selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff.
Z. Krebsforsch. 66, 389-408 (1965)

Dubois-Dalcq, M., McFarland, H., McFarlin, D.: Protein-A-Peroxidase. A valuable tool for the localisation of antigens.
J. Histochem. Cytochem. 25, 1201-1206 (1977)

Elling, H., Stavrou, D.: Über die Antigenität eines chemisch induzierten neurogenen Sarkoms der Ratte.
Vet. Pathol. 17, 477-489 (1980)

Fazekas de St. Groth, S., Scheidegger, D.: Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics.
J. Immunol. Methods 35, 1-21 (1980)

Fey, H., Pfister, H., Messerli, J., Sturzenegger, N., Grolimund, F.: Methods of isolation, purification and quantitation of bovine immunoglobulins.
Zbl. Vet. Med. B 23, 269-300 (1976)

Fields, K.L., Gosling, C., Megson, M., Stern, P.L.: New cell surface antigens in rat defined by tumors of the nervous system.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 4, 1296-1300 (1975)

Fischer, A., Brown, G.: A rapid method of determining whether monoclonal antibodies react with the same or different antigens on the cell surface.
J. Immunol. Methods 39, 377-385 (1980)

Fried, M., Chun, P.W.: Water-soluble nonionic polymers in protein purification.
Methods Enzymol. 22, 238-248 (1971)

Galfré, G., Howe, S.C., Milstein, C.: Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines.
Nature 266, 550-552 (1977)

Galfré, G., Milstein, C., Wright, B.: Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion on mous IgG. Nature 277, 131-133 (1979)

Galfré, G., Butcher, G.W., Howard, I.C., Wilde, C.D., Milstein, C.: Clonal competition and stability of hybrid myelomas of mouse and rat origin. Transplantation Proc. XII, No. 3, 371-375 (1980)

Galili, N., Naor, D., Åsjö, B., Klein, G.: Induction of immune responsiveness in a genetically low-responsive tumor-host combination by chemical modification of the immunogen. Europ. J. Immunol. 6, 473-476 (1976)

Gerhard, W., Croce, C.M., Lopes, D., Koprowski, H.: Repertoir of antiviral antibodies expressed by somatic cell hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 1510-1514 (1978)

Gerhard, W., Yewdell, J., Frankel, M.E., Lopes, A.D., Staudt, L.: Monoclonal antibodies against influenza virus. Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.) Monoclonal Antibodies, Plenum Press 1980

Goding, J.W.: Conjugation of antibodies with fluorochromes: modification to the standard methods. J. Immunol. Methods 13, 215-226 (1976)

Goding, J.W.: Antibody production by hybridomas. J. Immunol. Methods 39, 285-308 (1980)

Ghose, T., Ramakrishnan, S., Kulkarni, P., Blair, A.H., Vaughan, K., Nolido, H., Norvell, S.T., Belitsky, P.: Use of antibodies against tumor-associated antigens for cancer diagnosis and treatment. Transpl. Proc. Vol. XIII, No. 4 1970-1972 (1981)

Grabar, P., Williams, C.A.: Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophoretiques et immunochimiques d'un mélange de proteines. Appliquation au serum sanguin.
Biochim. Biophys. Acta 10, 193-194 (1953)

Graham, R.C., Lundholm, J.R.U., Karnovsky, M.: Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazol.
J. Histochem. Cytochem. 13, 150-152 (1965)

Hanfland, P., Uhlenbruck, G.: Aktuelle immunochemische Betrachtung zum Aufbau der Tumorzellmembran.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 85-101 (1978)

Hauschka, T.S., Weiss, L., Holbridge, B.A., Gudney, T.L., Zumpft, M., Planinsek, J.A.: Karyotypic and surface feature of murine TA-3 carcinoma cells during immunostimulation in rats and in mice.
J. Nat. Cancer Inst. 47, 343-357 (1971)

Hellström, K.E., Hellström, I., Brown, J.P.: Unique and common tumor specific transplantation antigens of chemically induced mouse sarkomas.
Int. J. Cancer 21, 317-322 (1978)

Hellström, K.E., Brown, J.P., Hellström, I.: Monoclonal antibodies to tumor antigens.
Contemp. Top. Immunobiol. Vol. II (1980)

Hengartner, H., Luzzati, A.L., Schreier, M.: Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X63-Ag8.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 92-99 (1978)

Herberman, R.B.: Immunogenicity of tumor antigens.
Biochem. Biophys. Acta 473, 93-119 (1977)

Herlyn, D., Herlyn, M., Steplewski, Z., Koprowski, H.: Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. Eur. J. Immunol. 9, 657-659 (1979a)

Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D., Koprowski, H.: Colorectal carcinoma-specific antigen: Detection by means of monoclonal antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1438-1442 (1979b)

Herlyn, D., Steplewski, Z., Herlyn, M., Koprowski, H.: Inhibition of growth of colorectal carcinoma in nude mice by monoclonal antibody. Cancer Res. 40, 717-721 (1980)

Herlyn, M., Clark, W.H., Mastrangelo, M.J., Du pont Guerry, I.V., Elder, D.E., La Rossa, D., Hamilton, R., Bondi, E., Tuthill, R., Steplewski, Z., Koprowski, H.: Specific immunoreactivity of hybridoma-secreted monoclonal anti-melanoma antibodies to cultured cells and freshly derived human cells. Cancer Res. 40, 3602-3609 (1980)

Hirt, P., Cravioto, H.: A new microcytotoxicity assay for in vitro demonstration of cellular immunity in experimental gliomas. J. Neuropath. Exp. Neurol. 35, 103 (1976)

Horibata, K., Harris, A.W.: Mouse myelomas and lymphomas in culture. Exp. Cell Res. 60, 61-77 (1970)

Katz, D.H., Benacerraf, B. (eds.): The role of the products of the histocompatibility gene complex in immune-response. Acad. Press. New York (1976)

Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K.: A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybridoma cell lines. J. Immunol. 123, 1548-1550 (1979)

Kennett, R.H., Denis, K.A., Tung, A.S., Klinman, N.R.: Hybrid plasmacytomaproduction: Fusion with adult spleen cells, monoclonal spleen fragments, neonatal spleen cells and human spleen cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 77-91 (1978)

Kennett, R.H., Gilbert, F.: Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain. Science 203, 1120-1121 (1979)

Klebe, R.J., Mancuso, M.G.: Chemicals which promote cell hybridisation. Somatic Cell Genetics 7, 473-488 (1981)

Klinman, N.R., Press, J.L., Sigal, N.H., Gerhart, P.J.: The generation of antibody diversity. Cunningham A.J. (ed.) Academic Press London 127-149 (1976)

Knutton, S., Pasternak, C.A.: The mechanism of cell-cell fusion. Trends Biochem. Science 4, 220-223 (1979)

Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497 (1975)

Köhler, G., Milstein, C.: Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur. J. Immunol. 6, 511-519 (1976)

Köhler, G., Howe, S.C., Milstein, C.: Fusion between immunoglobulin secreting and nonsecreting myeloma cell lines. Eur. J. Immunol. 6, 292-295 (1976)

Köhler, G., Shulman, M.J.: Cellular and molecular restrictions of the lymphocyte fusion.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 143-151 (1978)

Köhler, G.: Immunoglobulin chain loss in hybridoma lines.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2197-2199 (1980)

Koprowski, H., Steplewski, Z., Herlyn, D., Herlyn, M.: Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3405-3409 (1978a)

Koprowski, H., Gerhard, W., Wiktor, T., Martinis, J., Shander, M., Croce, C.M.: Anti-viral and anti-tumor antibodies produced by somatic cell hybrids.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 8-19 (1978b)

Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, D., Herlyn, M., Fuhrer, P.: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies.
Somatic Cell Genetics 6, 957-972 (1979)

Kornblith, P.L., Dohan, F.C., Wood, W.C., Whiteman, B.O.: Human astrocytoma serum mediated immunologic response.
Cancer 33, 1512-1519 (1974)

Kumar, S., Taylor, G.: Specific lymphocytotoxicity and blocking factors in tumors of the central nervous system.
Brit. J. Cancer 28, 135-141 (1973)

Kummer, U., Thiel, E., Doxiades, I., Eulitz, M., Stadoljev, S., Thierfelder, S.: Tritium radiolabeling of antibodies to high specific activity with N-succinimidyl(2,3-^{3}H)propionate: Use in detecting monoclonal antibodies.
J. Immunol. Methods 42, 367-374 (1981)

Lansdorp, P.M., Astaldi, G.C.B., Oosterhof, F., Janssen, M.C., Zeiljlemaker, W.P.: Immunoperoxidase procedures to detect monoclonal antibodies against cell surface antigens. Quantitation of binding and staining of individual cells.
J. Immunol. Methods 39, 393-405 (1980)

Lefkovits, I.: Introduction of antibody-forming cell clones in microcultures.
Eur. J. Immunol. 2, 360-366 (1972)

Lefkovits, I., Waldmann, H.: Limiting dilution analysis of cells in the immune system.
Cambridge Univ. Press 1979

Lehnhardt, W., Anderson, J., Continho, A., Melchers, F.: Cloning of murine transformed cell lines in suspension culture with efficiencies near 100%.
Exp. Cell Res. 111, 309-316 (1978)

Lemonnier, F., Burakoff, S.J., Germain, R.N., Benacerraf, B.: Cytolytic thymus-derived lymphocytes for allogenic stimulator cells crossreact with chemically modified syngeneic cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 74, 1229-1233 (1977)

Levy, R., Dilley, J., Lampson, L.A.: Human normal and leukemia cell surface antigens. Mouse monoclonal antibodies as probes.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 164-169 (1978)

Lim, R., Kluskens, L.: Immunological specifity of astrocytoma antigens.
Cancer Res. 32, 1667-1670 (1972)

Lindeman, J., Klein, P.A.: Immunological aspects of viral oncolysis.
Berlin, Springer Verlag 1967

Littlefield, J.W.: Selection of hybrids from mastings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinations. Science 145, 709 (1964)

McKearn, T.J.: Method for growing hybridomas in rats or mice. Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.) Monoclonal antibodies, Plenum Press 1980

Medina, D., Heppner, G.: Cell mediated "immunostimulation" induced by virusfree Balb/c mammary tumors. Nature (Lond.) 242, 329-330 (1973)

Minna, J.D., Cuttita, F., Rosen, S., Bum, P.A., Carney, D.N., Gazelar, A.F., Krasnow, S.: Methods for production of monoclonal antibodies with specifity for human lung cancer cells. In vitro 17, 1058-1070 (1981)

Mishell, B.B., Shiigi, S.M.: Selected methods in cellular immunology. Freeman and Companie, San Francisco 1980

Moranz, R.A., Wood, G.W., Foster, M., Clark, M., Gallahon, K.: Macrophages in experimental and human brain tumors. Part I: Studies of the macrophage content of experimental rat brain tumors of varying immunogenicity. J. Neurosurg. 50, 298-304 (1979)

Muralt, de, B., de Tribolet, N., Diserens, A.C., Carell, S., Mach, J.P.: Reactivity of antiglioma monoclonal antibodies for a large panel of cultured gliomas and other neuroectoderm derived tumors. in press

Nakane, P.K., Pierce, G.B.: Enzyme labelled antibodies. Preparation and application for localization of antigens. J. Histochem. Cytochem. 14, 929-931 (1966)

Nakane, P.K., Pierce, G.B.: Enzyme labelled antibodies for the light and electronmicroscopic localization of tissue antigens.
J. Cell Biol. 33, 307-318 (1967)

Nexø, B.A.: A plaque assay for murine leukemia virus using enzyme-coupled antibodies.
Virology 77, 849-852 (1977)

Oi, V.T., Jones, P.P., Goding, J.W., Herzenberg, L.A.: Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes H-2, and Ia-antigens.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 115-129 (1978)

Ouchterlony, Ö.: Diffusions-in-gel methods for immunological analysis II.
Progr. Allergy 6, 30-154 (1962)

Parks, D.R., Brayan, V.M., Herzenberg, L.A.: Antigen specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1962-1966 (1979)

Pateraki, E., Guesdon, J.L., Serrie, C., Avrameas, S.: Ter-ELISA: The Elisa-test performed in terasaki plates.
J. Immunol. Methods 46, 361-368 (1981)

Paul, J.: Zell- und Gewebekulturen.
De Gryter New York - Berlin 1980

Pearse, A.G.E.: Histochemistry. Theoretical and applied.
Churchill Livingstone, Edingburgh and London (1972)

Pfreundschuh, M., Shiku, H., Takahashi, T., Ueda, R., Oettgen, H.F., Ransohoff, J., Old, L.J.: Serological analysis of cell surface antigens of human malignant brain tumors.
Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 75, 5122-5126 (1978)

Pfreundschuh, M., Cravioto, H., Röhrich, M.: Serological analysis of cell surface antigens of nitrosourea-induced rat gliomas.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 99, A 71-A 72 (1981)

Posner, M.R., Antoniou, D., Griffin, J., Schlossman, S.F., Lazarus, H.: An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of monoclonal antibodies to cell surface antigens on viable cells.
J. Immunol. Methods 48, 23-31 (1982)

Potter, M.: Immunoglobulin producing tumors and myeloma proteins in mice.
Phys. Rev. 52, 631-719 (1972)

Prim, M.V., Cook, A.J., Baldwin, R.W.: Failure of neuraminidase treatment to influence tumorigenicity or immunogenicity of syngeneically transplanted rat tumor cells.
Eur. J. Cancer 14, 869-878 (1978)

Rainbird, S., Ridley, A.: Antigenicity of ethylnitrosourea-induced rat schwannomas assayed by in vitro lymphocytotoxicity.
Neuropath. Appl. Neurobiol. 3, 9-14 (1977)

Ray, P.K., Thakur, V.S., Sundaram, K.: Antitumor immunity. I. Different response of neuraminidase treated and x-irradiated tumor vaccine.
Eur. J. Cancer 11, 1-8 (1975)

Roitt, I.: Leitfaden der Immunologie
Darmstadt, Steinkopf Verlag 1977

Sanford, B.H.: An alteration in tumorhistocompatibility induced by neuraminidase.
Transplantation 5, 1273-1279 (1967)

Scheinberg, L.C., Edelman, F., Levy, A.: Is the brain an "immunologically privileged site"?
Arch. Neurol. 11, 248-264 (1964)

Schimmelpfeng, L., Langenberg, U., Peters, H.: Macrophages overcome mycoplasma infections of cells in vitro.
Nature 285, 661-662 (1980)

Schnegg, J.F., Diserens, A.C., Carrel, S., Accolla, R.S., de Tribolet, N.: Human glioma-associated antigens detected by monoclonal antibodies.
Cancer Res. 14, 1209-1213 (1981a)

Schnegg, F.J., de Tribolet, N., Diserens, A.C., Martin-Achard, A., Carrel, S.: Characterization of a rabbit anti human malignant glioma antiserum.
Int. J. Cancer 28, 265-269 (1981b)

Schneiderman, S., Faber, L., Baserga, R.: A simple method for degreasing the toxicity of polyethyleneglycol in mammalian cell hybridisation.
Som. Cell Genet. 5, 263-269 (1979)

Schreier, M., Köhler, G., Hengartner, H., Berec, C., Trucco, M., Forni, L.: Hybridoma Techniques.
EMBO, SKMB Course Basel 1980

Secher, D.: Monoclonal antibodies by cell fusion.
Immunology Today 2, 22-26 (1980)

Seeger, R.C., Rosenblatt, H.M., Imai, K., Ferrone, S.: Common antigenetic determinants on human melanoma, glioma, neuroblastoma, and sarcoma cells defined with monoclonal antibodies.
Cancer Res. 41, 2714-2717 (1981)

Shaerer, G.M.: Cell mediated cytotoxicity to trinitrophenyl modified syngeneic lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 4, 527-533 (1974)

Sheikh, K.M., Apuzzo, M.L., Kochsiek, K.R., Weiss, M.H.: Malignant glial neoplasms: Definition of a humoral host response to tumor-associated antigen(s). Yale J. Biol. Med. 50, 397-403 (1977)

Shoham, J., Inbar, M., Sachs, L.: Differential toxicity on normal and transformed in vitro and inhibition of tumor development in vitro by concanavalin A. Nature (Lond.) 227, 1244-1246 (1970)

Shulman, M., Wilde, C.D., Köhler, G.: A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. Nature 276, 269-270 (1978)

Sikora, K., Alderson, Th., Phillips, J., Watson, J.V.: Human hybridomas from malignant gliomas. The Lancet 2, 11-14 (1982)

Simmons, L.R., Rios, A.: Comparative immunotherapeutic effect of concanavalin A and neuraminidase-treated cancer cells. Transpl. Proc. 7, 247-251 (1975)

Singh, G., Bazin, H., Ladoulis, Ch.T.: In vitro synthesis and release of immunoglobulins by thymocyts of inbred rats. Molecular Immunology 16, 755-766 (1979)

Sjögren, H.O., Ankerst, J.: Effect of BCG and allogenic tumor cells on adenovirus type 12 tumorogenesis in mice. Nature (Lond.) 221, 863-864 (1969)

Spence, A.M., Hellström, K.E., Hellström, I., v. Belle, G., Sullivan, K., Wahlström, T.: Immunisation against ethylnitrosourea induced autochthonous neurogenic rat tumors. Brit. J. Cancer 40, 164-167 (1979)

Stavrou, D.: Beitrag zur Morphologie und Enzymhistochemie experimenteller Tumoren des Zentralnervensystems der Ratte. I. Morphologische Befunde. Acta Neuropath. (Berl.) 15, 220-230 (1970)

Stavrou, D., Haglid, K.G., Weidenbach, W.: The brainspecific proteins S-100 and 14.3.2. in experimental brain tumors of the rat.
Z. ges. exp. Med. 156, 237-242 (1971)

Stavrou, D., Haglid, K.G., Rönnbeck, L.: The S-100 protein in rat brain and in methyl-nitrosourea-induced tumors of the rat nervous system. A quantitative study.
Eur. Neurol. 10, 168-178 (1973)

Stavrou, D.: Mögliche immunologische Aspekte bei experimentellen neurogenen Tumoren.
Zbl. Allg. Path. 120, 535 (1976)

Stavrou, D., Anzil, A.P., Weidenbach, W., Rodt, H.: Immunofluorescence study of lymphocytic infiltrations in gliomas. Identification of T-lymphocytes.
J. Neurol. Sci. 33, 275-282 (1977)

Stavrou, D., Elling, H., Osterkamp, U.: Zytotoxische Antikörper gegen experimentelle Gliome.
Zbl. Allg. Path. 121, 568 (1977)

Stavrou, D., Anzil, A.P., Elling, H.: Tumor specific fluorescent and complement dependent cytotoxic antibodies in the serum of rats with chemically induced brain gliomas.
Acta Neuropath. (Berl.) 43, 111-117 (1978a)

Stavrou, D., Elling, H., Haglid, K.G.: Demonstration of humoral antibodies against autologous cells in experimental rabbit gliomas.
J. Neuropath. Exp. Neurol. 37, 694 (1978b)

Stavrou, D., Hultén, M., Anzil, A.P., Bilzer, Th.: The humoral antibody response of rats immunized with chemically modified syngeneic brain cells and glioma cells.
Int. J. Cancer 26, 629-637 (1980)

Stavrou, D., Hultén, M., Bilzer, Th.: Chemical modification and antigenicity of glioma cells.
Acta Neuropath. Suppl. VII, 75-78 (1981)

Stavrou, D., Bilzer, Th., Hultén, M.: Protektiver Effekt gegen syngene Gliomtransplantate durch Immunisierung mit chemisch modifizierten Gliomzellen.
Zbl. allg. Path. 125, 572 (1981)

Steele, G.J., Sjögren, H.O.: Crossreacting tumor-associated antigen(s) among chemically induced rat coloncarcinomas.
Cancer Res. 34, 1801-1807 (1974)

Suter, L., Brüggen, J., Serg, C.: Use of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for screening of hybridoma antibodies against cell surface antigens.
J. Immunol. Methods 39, 407-411 (1980)

Tho, B.H., Guli, E.P.G.: In vitro immunoreactivity against ethylnitrosurea induced tumors of the nervous system in rat.
Experientia 30, 1472-1473 (1974)

Thomas, C., Sierra, J.L., Kersting, G.: Hirntumoren bei Ratten nach oraler Gabe von N-Nitroso-N-Methylharnstoff.
Naturwissenschaften 54, 228-229 (1967)

Tribolet, de, N., Carrel, S.: Human glioma tumor associated antigen.
Cancer Immunol. Immunother. 9, 207-211 (1980)

Trouillas, P.: Carcinofetal antigen in rat glial tumors.
Lancet 2, 552 (1971)

Trowbridge, I.S.: Interspecies spleen-myeloma hybrids producing McAbs against mouse lymphocyte surface glycoprotein, T200.
J. Exp. Med. 313-322 (1978)

Tung, A.S., Ju, S.-T., Sato, S., Nisonoff, A.: Production of large amounts of antibodies in individual mice.
J. Immunol. 116, 676 (1976)

Warnatz, H.: Tumorimmunologie
Stuttgart Thieme 1975

Wahlström, T., Saksela, E., Troupp, H.: Cell bound antiglial immunity in patients with malignant tumors of the brain.
Cell Immunol. 6, 161-170 (1973)

Wahlström, T., Linder, E., Saksela, E., Westermark, B.: Tumor specific membrane antigens in established cell lines from gliomas.
Cancer 34, 274-279 (1974)

Wechsler, W., Pfeiffer, S.E., Svenberg, J.A., Koestner, A.: S-100 protein in methyl- and ethylnitrosurea induced tumors of the rat nervous system.
Acta neuropath. (Berl.) 24, 287-303 (1973)

Weiss, D.W., Bonhagen, R.S., De Ome, K.: Protective activity of fractions of tubercle bacilli against isologous tumors in mice.
Nature (Lond.) 190, 889-891 (1961)

Wikstrand, C.J., Mahaley, M.S., Bigner, D.D.: Surface antigenic characteristic of human glial brain tumor cells.
Cancer Res. 37, 4267-4275 (1977)

Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.: Surface antigens of human glioma cells shared with normal and fetal brain.
Cancer Res. 39, 3235-3243 (1979)

Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.: Expression of human fetal brain antigens by human tumors of neuroectodermal origin as defined by monoclonal antibodies.
Cancer Res. 42, 267-275 (1982)

Woosley, R.E., Mahaley, M.S.J., Mahaley, J.L., Miller, G.M., Brooks, W.H.: Immunobiology of primary intracranial tumors. Part 3: Microcytotoxicity assays of specific response of brain tumor patients. J. Neurosurg. 47, 871-885 (1977)

Yeh, M.J., Hellström, I., Brown, J.P., Warner, G.A., Hansen, J.A., Hellström, K.E.: Cell surface antigens of human melanoma identified by monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2927-2931 (1979)

Yeh, M.J., Hellström, I., Hellström, K.E.: Clonal variation in expression of a human melanoma antigen defined by a monoclonal antibody. J. Immunol. 126, 1312-1317 (1981)

Yelton, D.E., Diamond, B.A., Kwan, S.-P., Scharff, M.D.: Fusion of mouse myeloma and spleen cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 1-7 (1978)

Yelton, D.E., Margulies, D.H., Diamond, B., Scharff, M.: Plasmocytomas and hybridomas. Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.) Monoclonal antibodies, Plenum Press (1980)

Bei allen, die mir auf so vielfältige Weise bei der Entstehung dieser Arbeit zur Seite standen, möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Prof. Dr. D. Stavrou für die Überlassung des Themas und für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Frau D. Wallmann war mir bei der Durchführung der Experimente eine wertvolle Hilfe.

Für ihre technische Hilfeleistung bedanke ich mich bei Frau A. Lechner und Herrn S. Lutz.

Lebenslauf

1955	geboren am 12. August in Grötzingen/Württemberg
	Vater: Dr. med. vet. Max Süß Prakt. Tierarzt
	Mutter: Brigitte Süß, geb. Aehle
1962-1966	Besuch der Grundschule in Dettingen-Teck
1966-1975	Besuch des Gymnasiums in Kirchheim-Teck
1975	22. Mai Reifezeugnis
1975-1980	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1980	Beginn der Dissertation am Institut für Tierpathologie, Abteilung Funktionelle Pathologie (Prof. Dr. D. Stavrou) der Universität München
1981	1. Januar - 31. Dezember Tätigkeit als Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Tierpathologie, Abteilung Funktionelle Pathologie, der Universität München
	17. Februar Approbation als Tierärztin
1982	Freie Forschungstätigkeit am Institut für Tierpathologie, Abteilung Funktionelle Pathologie, der Universität München mit dem Ziel der Promotion